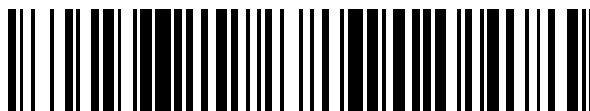


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 769 031**

51 Int. Cl.:

C07D 495/04 (2006.01)

A61K 31/407 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.03.2016** **PCT/IB2016/051465**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.09.2016** **WO16151432**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2016** **E 16714004 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.12.2019** **EP 3271365**

54 Título: **Agentes citotóxicos bifuncionales que contienen el farmacóforo CTI**

30 Prioridad:

20.03.2015 US 201562136223 P

26.03.2015 US 201562138505 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

24.06.2020

73 Titular/es:

PFIZER INC. (100.0%)
235 East 42nd Street
New York, NY 10017, US

72 Inventor/es:

MADERNA, ANDREAS;
SUBRAMANYAM, CHAKRAPANI;
TUMEY, LAWRENCE N.;
CHEN, ZECHENG y
CASAVANT, JEFFREY M.

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 769 031 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

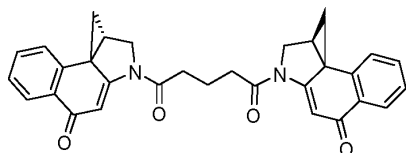
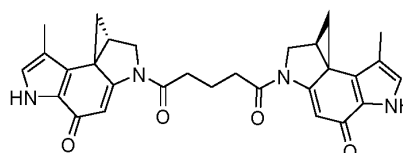
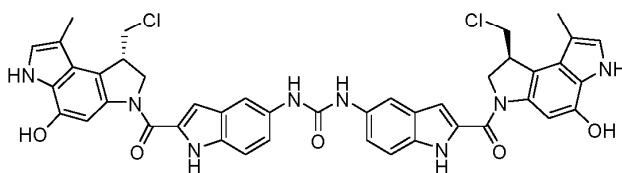
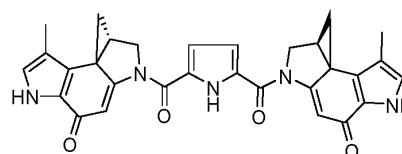
Agentes citotóxicos bifuncionales que contienen el farmacóforo CTI

Campo de la invención

La presente invención está dirigida a nuevos dímeros bifuncionales CTI-CTI útiles para el tratamiento de enfermedades proliferativas. Los dímeros de la invención pueden funcionar como medicamentos independientes, cargas útiles en conjugados anticuerpo-fármaco (CAF) y compuestos de carga útil de enlace útiles en conexión con la producción o administración de tales CAF. La presente invención se refiere además a composiciones que incluyen los dímeros mencionados anteriormente, cargas útiles de enlace y CAF, y procedimientos para el uso de estos dímeros, cargas útiles de enlace y CAF, para el tratamiento de afecciones patológicas, incluido el cáncer.

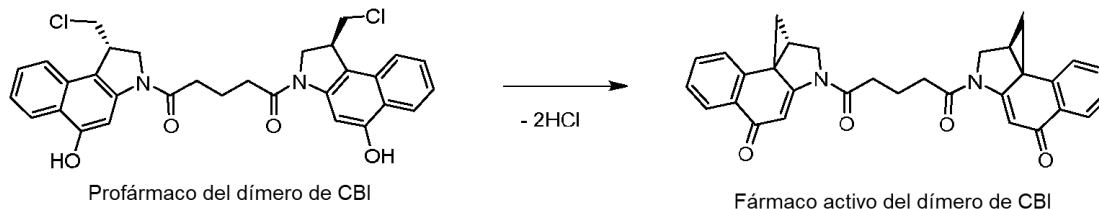
Antecedentes

Los análogos bifuncionales que contienen dos motivos de alquilación de ADN activos (es decir, un CBI o un CPI) contienen dos alquilaciones (por ejemplo, dos motivos de CPI) fusionados. Debido a la presencia de dos motivos de alquilación reactivos, estos compuestos son reticuladores de ADN activos, mientras que los compuestos con un solo motivo de alquilación (por ejemplo, duocarmicinas) son mono-alquiladores de ADN.

Dímero de CBI **A**Dímero de CPI **B**Dímero de CPI (Bizelesin) **C**Dímero de CPI **D**

Los compuestos mostrados anteriormente son ejemplos representativos de las referencias y se ha documentado que son citotoxinas potentes: **A** ("Glycosidic Prodrugs of Highly Potent Bifunctional Duocarmycin Derivatives for Selective Treatment of Cancer", *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010, 49, 7336 -7339; "Duocarmycin Analogues Target Aldehyde Dehydrogenase 1 in LungCancer Cells", *Angew. Chem. Int. Ed.* 2012, 51, 2874 -2877; "Bifunctional prodrugs and drugs", WO 2011/054837, DE 10 2009 051 799; "The Two Faces of Potent Antitumor Duocarmycin-Based Drugs: A Structural Dissection Reveals Disparate Motifs for DNA versus Aldehyde Dehydrogenase 1 Affinity", *Angew. Chem. Int. Ed.* 2013, 52, 1-6; **B** ("Interstrand DNA Cross-linking with Dimers of the Spirocyclopropyl Alkylating Moiety of CC-1065", *J. Am. Chem. Soc.* 1989, 111, 6428-6429; "CC-1065 analogs having two CPI subunits useful as antitumor agents and ultraviolet light absorbers", *Eur. Pat. Appl.* (1990), EP 359454, también para los compuestos **C** y **D**; **C** ("Synthesis and DNA Cross-Linking by a Rigid CPI Dimer", *J. Am. Chem. Soc.* 1991, 113, 8994-8995; "Nucleotide Preferences for DNA Interstrand Cross-Linking Induced by the Cyclopropylpyrroloindole Analogue U-77,779", *Biochemistry* 1993, 32, 2592-2600; "Determination of the Structural Role of the Internal Guanine-Cytosine Base Pair in Recognition of a Seven-Base-Pair Sequence Cross-Linked by Bizelesin", *Biochemistry* 1995, 34, 11005-11016; "Analysis of the Monoalkylation and Cross-Linking Sequence Specificity of Bizelesin, a Bifunctional Alkylation Agent Related to (+)-CC-1065", *J. Am. Chem. Soc.* 1993, 115, 5925-5933; "Mapping of DNA Alkylation Sites Induced by Adozelesin and Bizelesin in Human Cells by Ligation-Mediated Polymerase Chain Reaction", *Biochemistry* 1994, 33, 6024-6030; "DNA Interstrand Cross-Links Induced by the Cyclopropylpyrroloindole Antitumor Agent Bizelesin Are Reversible upon Exposure to Alkali", *Biochemistry* 1993, 32, 9108-9114; "Replacement of the Bizelesin Ureadiyl Linkage by a Guanidinium Moiety Retards Translocation from Monoalkylation to Cross-Linking Sites on DNA", *J. Am. Chem. Soc.* 1997, 119, 3434-3442; "DNA interstrand cross-linking, DNA sequence specificity, and induced conformational changes produced by a dimeric analog of (+)-CC-1065", *Anti-Cancer Drug Design* (1991), 6, 427-452; "A phase I study of bizelesin, a highly potent and selective DNA interactive agent, in patients with advanced solid malignancies", *Ann Oncol.* mayo de 2003; 14(5):775-782; "A Phase I study of bizelesin (NSC 615291) in patients with advanced solid tumors", *Clin Cancer Res.* 2002, 3, 712-717; "Solution conformation of a bizelesin A-tract duplex adduct: DNA-DNA cross-linking of an A-tract straightens out bent DNA", *J Mol Biol.* 1995, 252, 86-101; "Preclinical pharmacology of bizelesin, a potent bifunctional analog of the DNA-binding antibiotic CC-1065", *Cancer Chemother Pharmacol.* 1994, 34, 317-322; y **D** ("CC-1065 analogs having two CPI subunits useful as antitumor agents and

ultraviolet light absorbers", Eur. Pat. Appl. (1990), EP 359454. El motivo de alquilación de ADN activo puede, en principio, existir en forma de profármaco que se convierte en el fármaco activo en el medio biológico, o en su estado activo que no requiere conversión adicional. La conversión de profármaco a fármaco activo para los reticuladores bifuncionales se ejemplifica en el dímero CBI que se muestra a continuación:



5

Se lleva a cabo una conversión correspondiente para todos los reticuladores bifuncionales que existen en sus estados de profármaco.

Se han documentado otros reticuladores bifuncionales relacionados. ("Chemical and Biological Explorations of the Family of CC-1065 and the Duocarmycin Natural Products", Current Topics in Medicinal Chemistry, 2009, 9, 1494-1524; "DNA interstrand cross-linking agents and their chemotherapeutic potential", Curr Med Chem. 2012, 19, 364-385; "Design and Synthesis of a Novel DNA-DNA Interstrand Adenine-Guanine Cross-Linking Agent", J. Am. Chem. Soc. 2001, 123, 4865-4866; "Effect of base sequence on the DNA cross-linking properties of pyrrolobenzodiazepine (PBD) dimers", Nucleic Acids Res. 2011, 39, 5800-5812; "Sequence-selective recognition of duplex DNA through covalent interstrand cross-linking: kinetic and molecular modeling studies with pyrrolobenzodiazepine dimers", Biochemistry. 2003, 42, 8232-8239; "Bifunctional alkylating agents derived from duocarmycin SA: potent antitumor activity with altered sequence selectivity", Bioorg Med Chem Lett. 2000, 10, 495-498; "Design, Synthesis and Cytotoxicity Evaluation of 1-Chloromethyl-5-hydroxy-1,2-dihydro-3H-benz[e]indole (seco-CBI) Dimers", Bioorganic & Medicinal Chemistry 2000, 8, 1607-1617.

Zhao y col. describieron una estrategia de profármacos de fosfato para citotoxinas que contienen seco-CBI monomérico. ("Synthesis and biological evaluation of antibody conjugates of phosphate prodrugs of cytotoxic DNA alkylators for the targeted treatment of cancer", J. Med. Chem. 2012, 55, 766-782) y Zhang y col. ("Immunoconjugates containing phosphate-prodrugged DNA minor groove binding agents, compositions containing them, and methods of making them and their use for treating cancer", WO 2012/162482).

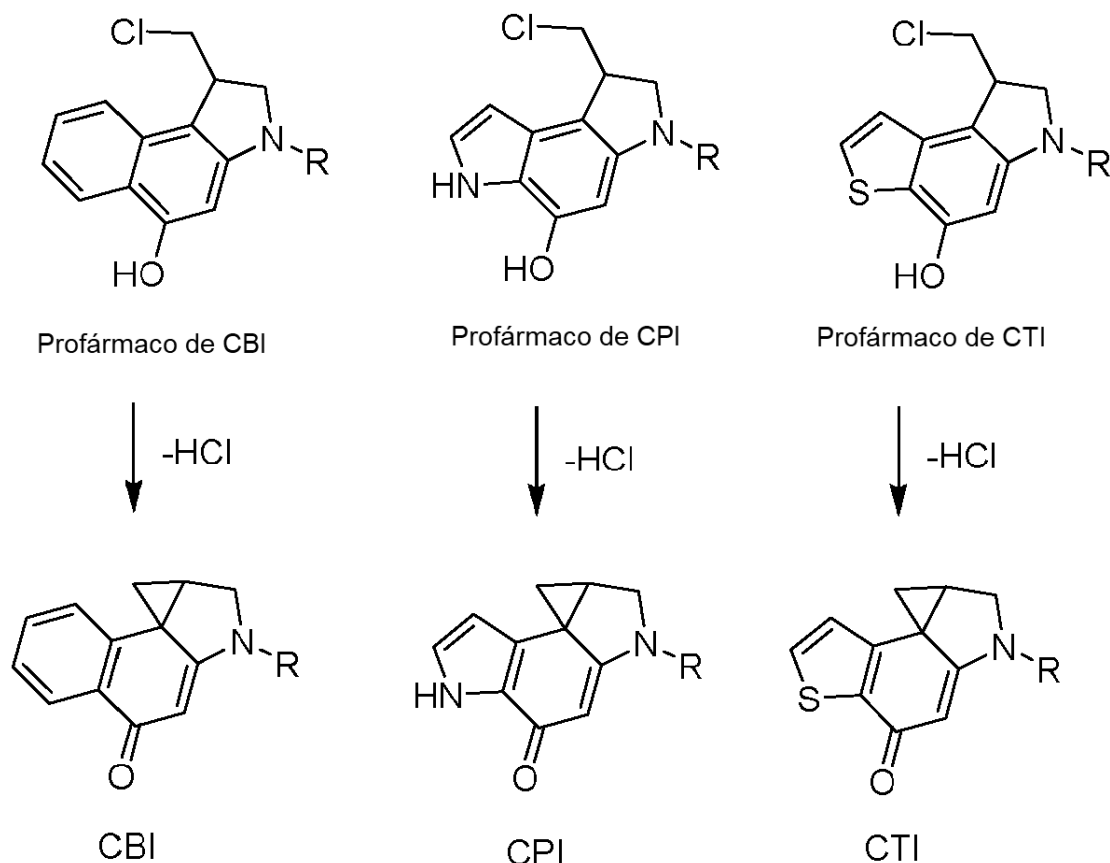
Recientemente se han descrito ciertos dímeros de CBI como cargas útiles de CAF ("1-(Chloromethyl)-2,3-Dihydro-1H-Benzo[e]indole Dimer Antibody-Drug Conjugate Compounds, and Methods of Use and Treatment", WO2015/023355).

La conjugación de fármacos con anticuerpos, ya sea directamente o mediante enlazadores, implica una consideración de una variedad de factores, incluyendo la identidad y ubicación del grupo químico para la conjugación del fármaco, el mecanismo de liberación del fármaco, los elementos estructurales que proporcionan la liberación del fármaco y la modificación estructural del fármaco libre liberado. Además, si el fármaco se va a liberar después de la internalización de anticuerpos, el mecanismo de liberación del fármaco debe estar en consonancia con el tráfico intracelular del conjugado.

Si bien se han probado una serie de diferentes clases de medicamentos para su administración mediante anticuerpos, solo unas pocas clases de fármacos han demostrado ser eficaces como conjugados de fármacos de anticuerpos, manteniendo un perfil de toxicidad adecuado. Una de esas clases es la de las auristatinas, derivados del producto natural dolastatina 10. Las auristatinas representativas incluyen (N-metilvalina-valinadolaisoleuina-dolaproina-norefedrina) y (N-metilvalina-valina-dolaisoleuina-dolaproina-fenilalanina). Otros agentes de unión a la tubulina relacionados incluyen las maytansinas (por ejemplo, véase "Cell-binding agent-maytansinoid conjugates linked via a noncleavable linker, preparation methods, and methods using them for targeting specific cell populations" publicado como el documento WO 2005/037992). Otros fármacos citotóxicos que se han empleado en la unión con anticuerpos incluyen fármacos que se unen al ADN, tales como la caliqueamicina, que causa la escisión del ADN de doble cadena específica de la secuencia. Otra clase de fármacos citotóxicos que se unen al ADN empleados en los CAF incluye pirrolobenzodiazepinas diméricas (por ejemplo, véase "Preparation of unsymmetrical pyrrolobenzodiazepines dimers for inclusion in targeted conjugates" publicado como el documento WO2013/041606). Otra clase de fármaco de este tipo en el que se ha intentado la administración por anticuerpos son los agentes alquilantes de unión al ADN, tales como el análogo de duocarmicina CC-1065 (véase "Preparation of CC-1065 analogs and their conjugates for treatment of cancer" publicado como el documento WO2010/062171) y compuestos relacionados (véase "Antibody-drug peptide conjugates for use as cytotoxins in cancer treatment" publicado como el documento WO 2007/038658, y "Immunoconjugates containing phosphate-prodrugged DNA minor groove binding agents, compositions containing them, and methods of making them and their use for treating cancer" publicado como el documento WO2012/162482). Sin embargo, todos estos fármacos tienen limitaciones relacionadas con las indicaciones de la enfermedad y el perfil de tratamiento, y por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de fármacos adicionales con propiedades mejoradas que se puedan administrar mediante la conjugación con anticuerpos. Por consiguiente, la presente invención proporciona

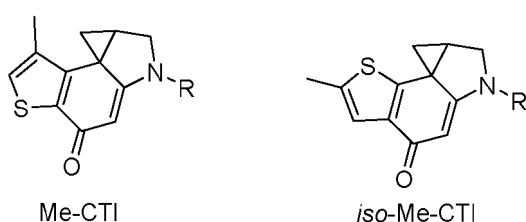
nuevos CAF con dímeros como cargas útiles.

Otro heterociclo que se sabe que es un potente motivo de alquilación de ADN está representado por el grupo "CTI" (CTI: 1,2,8,8a-tetrahidro-4H-ciclopropa[c]tieno[3,2-e]indol-4-ona, "Fundamental relationships between structure, reactivity, and biological activity for the duocarmycins and CC-1065", J. Med. Chem. 2009, 52(19), 5771-5780, "Rational Design, Synthesis, and Evaluation of Key Analogues of CC-1065 and the Duocarmycins", J. AM. CHEM. SOC. 2007, 129, 14092-14099). Los monómeros de duocarmicina que contienen CTI se han descrito como cargas útiles de CAF ("Synthesis of functionalized thieno-indole derivs. optionally containing a peptidic residue for the treatment of cancer and their use in the preparation of conjugates", WO 2013/149946, "Preparation of new functionalized alkylating agents containing a thieno-indole moiety linked to a DNA-binding moiety for treating cancers and their use in the prepn. of conjugates", WO 2013/149948). Las diferencias estructurales entre "CBI", "CPI" y "CTI" se representan en el siguiente dibujo:



CBI, CPI y CTI difieren en el primer anillo aromático, teniendo el CBI un fenilo, el CPI un pirrol y el CTI un heterociclo de tiofeno, respectivamente. El dibujo también muestra los profármacos de cloruro. Estos profármacos se convierten en el fármaco activo en el medio biológico bajo pérdida de cloruro de hidrógeno. Por lo tanto, tanto el profármaco de cloruro como la especie de ciclopropilo activo deben considerarse equivalentes con respecto a su actividad biológica. El concepto de los profármacos de cloruro para CBI, CPI y los grupos relacionados han sido bien documentados en las referencias ("Design, Synthesis, and Evaluation of Duocarmycin O-Amino Phenol Prodrugs Subject", J. Med. Chem. 2010, 53, 7731-7738 y la referencia 8 citada en el presente documento).

Con respecto al grupo CTI, dos variaciones estructurales son de particular interés, a saber, los grupos Me-CTI e *iso*-Me-CTI que se muestran en el siguiente dibujo:



Ambos grupos Me-CTI e *iso*-Me-CTI se han descrito en el contexto de duocarmicinas ("Chemical and biological explorations of the family of CC-1065 and the duocarmycin natural products", Curr Top Med Chem. 2009, 9(16), 1494-1524).

Sumario de la invención

- 5 La invención describe nuevos análogos de dímeros estructurales basados en el motivo CTI. La invención también describe elementos espaciadores para los correspondientes dímeros de CTI. Se desvelan estructuras mixtas CBI-CTI. Los términos CBI y CTI se usan tanto para la versión de profármacos de cloruro como para las especies de ciclopropilo activas. Además, se describe la sustitución del enlazador a estas especies diméricas, así como la preparación de conjugados anticuerpos-fármacos.
- 10 No se conocen dímeros que contengan el motivo CTI y el uso de dímeros CTI en la presente invención da como resultado cambios significativos en la reactividad química y las propiedades biológicas en comparación con las especies de dímeros descritas anteriormente. Por lo tanto, los dímeros preparados con especies CTI representan entidades farmacológicas distintivas. En la presente invención, los presentes inventores describen nuevos dímeros que contienen dos grupos CTI. Además, los presentes inventores desvelan cómo estas especies de dímeros están
- 15 conectadas a moléculas enlazadoras adecuadas para la unión a anticuerpos.

De manera más específica, la presente invención está dirigida a dímeros citotóxicos que comprenden dímeros a base de CTI/CTI (incluyendo las formas seco de CTI, tal como se detalla en el presente documento), a conjugados de anticuerpos-fármacos que comprenden tales dímeros, y a procedimientos para el uso de los mismos para tratar el

20 cáncer y otras indicaciones. Tanto las estructuras CTI como CBI se pueden representar por su forma seco y puede sustituirse y derivatizarse tal como se detalla en el presente documento. Además, la función fenol en las formas seco puede derivatizarse con grupos acetato. Las funciones de acetato fenólico son funcionalmente equivalentes al fenol ya que los grupos acetato se hidrolizan fácilmente para dar los fenoles libres en medio biológico.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a compuestos y composiciones farmacéuticas que los contienen, a su preparación, y a los usos de los compuestos, principalmente, pero no exclusivamente, agentes anticancerígenos. De

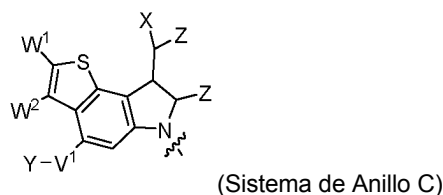
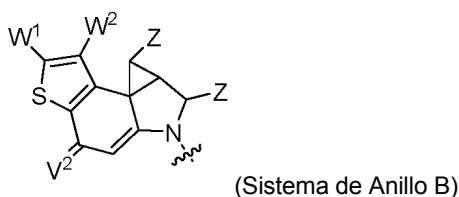
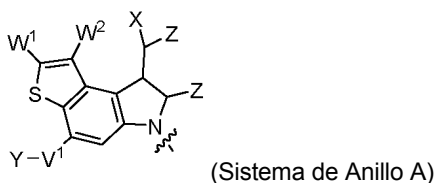
25 acuerdo con un aspecto, la presente invención se refiere a compuestos de "carga útil" de la reivindicación 1.

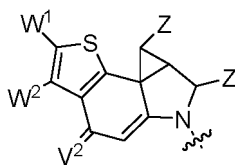
También se desvelan compuestos de Fórmula I:



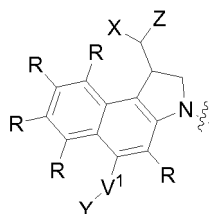
o una sal farmacéuticamente aceptable o solvato de los mismos, en la que: cada uno de F^1 y F^2 se selecciona independientemente entre los sistemas de anillo A, B, C, D, E, F, G y H:

30

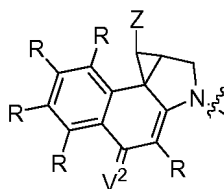




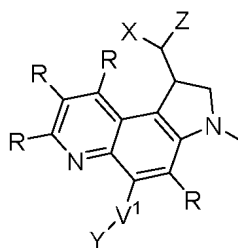
(Sistema de Anillo D)



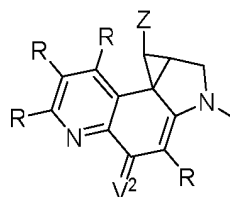
(Sistema de Anillo E)



(Sistema de Anillo F);



(Sistema de Anillo G)



(Sistema de Anillo H)

5

donde:

está presente al menos uno de los sistemas de anillo A, B, C y D;

10

cada R se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H, -alquilo C₁-C₂₀, -alquenilo C₂-C₆, -alquinilo C₂-C₆, halo, deuterio, hidroxilo, alcoxi, -NH₂, -NH(alquilo C₁-C₈), -N(alquilo C₁-C₈)₂, -NO₂, -arilo C₆-C₁₄ y -heteroarilo C₆-C₁₄, en los que dos o más R se unen opcionalmente para formar un anillo o anillos, y en los que dicho -arilo C₆-C₁₄ y -heteroarilo C₆-C₁₄ están opcionalmente sustituidos con 1 a 5 sustituyentes seleccionados independientemente entre -alquilo C₁-C₁₀, -alcoxi C₁-C₁₀, -halo, -alquiltio C₁-C₁₀, -trifluorometilo, -NH₂, -NH(alquilo C₁-C₈), -N(alquilo C₁-C₈)₂, -alquil C₁-C₁₀-N(alquilo C₁-C₈)₂, -alquiltio C₁-C₃, -NO₂ o -heterociclilo C₁-C₁₀, para cada sistema de anillo en el que aparece R;

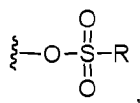
15

cada V¹ es independientemente un enlace, O, N(R) o S, para cada sistema de anillo en el que aparece V¹;

cada V² es independientemente O, N(R) o S, para cada sistema de anillo en el que aparece V²;

cada uno de W¹ y W² es independientemente H, -alquilo C₁-C₅, -fenilo, -C(O)OR, -C(O)SR, -C(O)NHN(R)₂ o -C(O)N(R)₂ para cada sistema de anillo en el que aparecen W¹ y W²;

cada X es independientemente -OH, -O-acilo, azido, halo, cianato, tiocianato, isocianato, tioisocianato, o



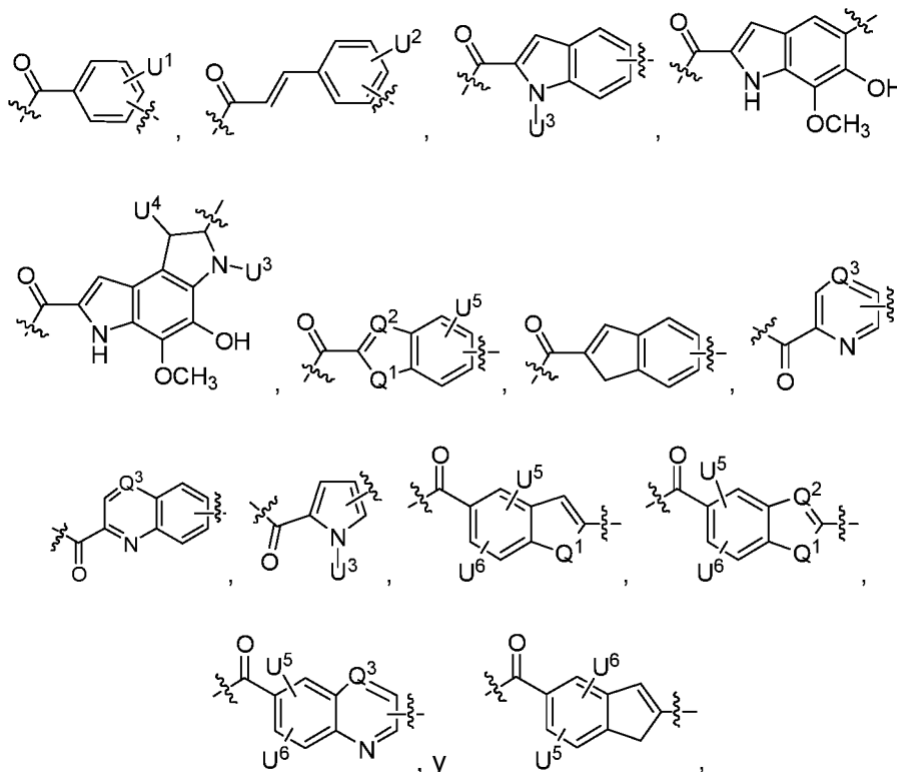
para cada sistema de anillo en el que aparece X;

cada Y se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H, -alquil C₁-C₆-R^A, -C(O)R^A, -C(S)R^A, -C(O)OR^A, -S(O)₂OR^A, -C(O)N(R^A)₂, -C(S)N(R^A)₂, un carbohidrato, glicosilo, -NO₂, -PO(OR^A)₂, un aminoácido, y un péptido (por ejemplo, un péptido que se escinde con proteasas tales como catepsinas y metaloproteinasas de matriz) para cada sistema de anillo en el que aparece Y, en el que cada R^A se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H, -alquilo C₁-C₂₀, -heteroalquilo C₁-C₈, -arilo C₆-C₁₄, aralquilo, -heterociclilo C₁-C₁₀, -carbociclilo C₃-C₈ y -alquil C₁-C₂₀-N(R)₂,

en el que dichos alquilo -C₁-C₂₀, -heteroalquilo C₁-C₈, -arilo C₆-C₁₄, aralquilo, -heterociclilo C₁-C₁₀, -carbociclilo C₃-C₈ y -alquil C₁-C₂₀-N(R)₂ están opcionalmente sustituidos con 1 a 3 sustituyentes seleccionados independientemente entre R;

cada Z se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H, -alquilo C₁-C₈, -heteroalquilo C₁-C₈, -arilo C₆-C₁₄, -aralquilo, -heterociclilo C₁-C₁₀, -carbociclilo C₃-C₈, -C(O)Oalquilo C₁-C₈, -C(O)N(alquilo C₁-C₈)₂, -C(O)OH, -C(O)NHNH₂ y -C(O)-halo, y en el que dichos alquilo C₁-C₈, -heteroalquilo C₁-C₈, -arilo C₆-C₁₄, -aralquilo, -heterociclilo C₁-C₁₀, -carbociclilo C₃-C₈, -C(O)Oalquilo C₁-C₈, -C(O)N(alquilo C₁-C₈)₂, -C(O)OH, -C(O)NHNH₂ y -C(O)-halo están cada uno opcionalmente sustituido con 1 a 3 sustituyentes seleccionados independientemente entre R, para cada sistema de anillo en el que aparece Z;

cada uno de L¹ y L² se selecciona independientemente entre un enlace directo, carbonilo o un grupo carbonil acilo unido a F¹ o F² en el resto acilo, donde el grupo carbonil acilo se selecciona entre el grupo que consiste en:



en el que

U¹ se selecciona entre H, -CH₃, -OH, -OCH₃, -NO₂, -NH₂, -NHNHAc, -NHNHC(O)CH₃, -NHC(O)fenilo o -halo,

U² es H, -OH o -OCH₃,

U³ es H, -CH₃ o -C₂H₅,

U⁴ es H o CH₃S-,

cada uno de U⁵ y U⁶ se selecciona independientemente entre H, -halo, -alquilo C₁-C₄, -alcoxi C₁-C₃, -dialquilamino C₁-C₆, -NO₂-NHC(O)alquilo C₁-C₁₀, -OH, -NH₂, -NHC(O)NH₂, -NHC(O)CH₃ o -NHC(O)fenilo,

Q¹ es -O-, -S- o -NH-, y

5 cada uno de Q² y Q³ es independientemente -CH- o -N-;

T se selecciona entre:

- NHC(O)-,

- C(O)NH-,

- C(O)O-,

10 - OC(O)-,

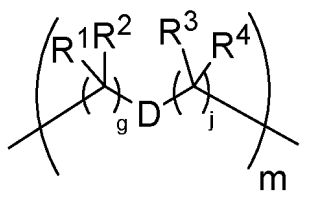
- NR^B-T¹-NR^C- donde cada uno de R^B y R^C es independientemente H o -alquilo C₁-C₈, o R^B y R^C juntos se unen para formar un anillo y juntos son (CH₂)₂₋₃, donde T¹ se selecciona entre el grupo que consiste en -C(O)-, -C(O)(CH₂)_nC(O)- donde n es un número entero de 0 a 50 y -C(O)PhC(O)- donde Ph es 1,3- o 1,4-fenileno, y donde T¹ está opcionalmente sustituido con 1-2 R,

15 - C(O)hetC(O)- en el que het es un heteroarilo mono-, bi- o tricíclico de 5 a 12 miembros, que contiene uno, dos o tres heteroátomos seleccionados independientemente entre O, N, S, P y B, en el que het está opcionalmente sustituido con 1 a 8 sustituyentes, cada uno seleccionado independientemente entre el grupo que consiste en -alquilo C₁-C₈, -heteroalquilo C₁-C₈, -arilo C₆-C₁₄, -aralquilo, -heterociclilo C₁-C₁₀, -carbociclilo C₃-C₈, -NH₂, -NHR^D y -NO₂, y dichos sustituyentes opcionales en het están opcionalmente sustituidos con R^E,

20 en el que cada R^D se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H, -alquilo C₁-C₈, -C(O)-alquilo C₁-C₈, -heteroalquilo C₁-C₈, -arilo C₆-C₁₄, -aralquilo, -heterociclilo C₁-C₁₀, -carbociclilo C₃-C₈, -C(O)Oalquilo C₁-C₈, -C(O)N(alquilo C₁-C₈)₂ y -C(O)-halo, opcionalmente sustituido con R^E,

en el que cada R^E se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H, -alquilo C₁-C₈, -heteroalquilo C₁-C₈, -arilo C₆-C₁₄, -aralquilo, -heterociclilo C₁-C₁₀, -carbociclilo C₃-C₈, -C(O)Oalquilo C₁-C₈, -C(O)N(alquilo C₁-C₈)₂ y -C(O)-halo, y en el que cada R^E está opcionalmente sustituido con 1 a 3 sustituyentes seleccionados independientemente entre R,

25 -C(A¹)X¹-T²-X¹C(B¹)-, donde T² es:



30 en el que cada X¹ es independientemente un enlace, -NR^E-, -O- o -S-, en el que cada uno de A¹ y B¹ es independientemente =O o =S, en el que cada uno de R¹, R², R³ y R⁴ es independientemente R^E o R¹ y R² forman un sistema de anillo, o R³ y R⁴ forman un sistema de anillo, o ambos R¹ y R², y R³ y R⁴, forman cada uno independientemente sistemas de anillo, o R¹ y R³ forman un sistema de anillo, o R² y R⁴ forman un sistema de anillo, o ambos R¹ y R³, y R² y R⁴, forman cada uno independientemente sistemas de anillo,

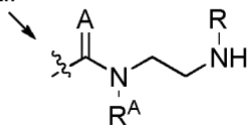
35 donde dichos sistemas de anillo se seleccionan independientemente entre -heterociclilo C₁-C₁₀ o -carbociclilo C₃-C₈, o cada uno de R¹, R², R³ y R⁴ es un enlace a diferentes carbonos en D, en el que cada uno de g y j es independientemente un número entero de 0 a 50 y m es un número entero de 1 a 50, y en el que D es un enlace o se selecciona entre el grupo que consiste en -S-, -alquileno C₁-C₈-, -arileno C₆-C₁₄-, -heteroarileno C₆-C₁₄-, -heteroalquileno C₁-C₈-, -aralquileno, -heterociclo C₁-C₁₀ y -carbociclo C₃-C₈, donde dichos -alquileno C₁-C₈-, -arileno C₆-C₁₄-, -heteroarileno C₆-C₁₄-, -heteroalquileno C₁-C₈-, -aralquileno, -heterociclo C₁-C₁₀ y -carbociclo C₃-C₈ están opcionalmente sustituidos con -R^E-, -C(O)R^E-, -C(O)OR^E-, -N(R^E)₂-, -N(R)C(O)R^E o -N(R)C(O)OR^E, y D está opcionalmente sustituido adicionalmente con 1 a 2 R, y -G¹-T²-G²-, donde cada uno de G¹ y G² es independientemente -S(O)X¹- o -S(O)₂X¹-.

En realizaciones de los compuestos desvelados, la variable n es de 0 a 50, preferentemente de 0 a 25, preferentemente de 0 a 10, y preferentemente 1-5. Preferentemente, la variable n puede ser 0, 1, 2, 3, 4 o 5.

45 En otras realizaciones de los compuestos desvelados, la variable -Y- es C(O)N(R^A)₂ o C(S)N(R^A)₂ donde un R^A es

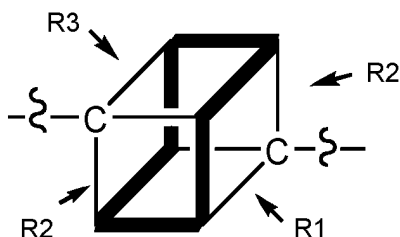
hidrógeno o -alquilo C_1-C_{20} y el otro R^A es -alquilo $C_1-C_{20}-N(R)_2$, de tal forma que la estructura:

conexión con el resto de la carga útil



se forma, donde A es oxígeno o azufre.

- 5 Como se ha indicado anteriormente, realizaciones de los presentes compuestos desvelados incluyen aquellas en las que cada uno de R^1 , R^2 , R^3 y R^4 se une a diferentes carbonos en D. Cuando D es un anillo carbocíclico de 6 miembros (en negrita, a continuación), esta realización puede tomar la forma de un cubano:



También son posibles otras formas de cubanos (por ejemplo, formas sustituidas como las que se resumen en el presente documento) y no cubanos y se incluyen dentro de la invención.

- 10 De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un compuesto "enlazador-carga útil" de la reivindicación 2.

También se desvelan compuestos "enlazador-carga útil" de Fórmula IIA:

L-P (Fórmula IIA)

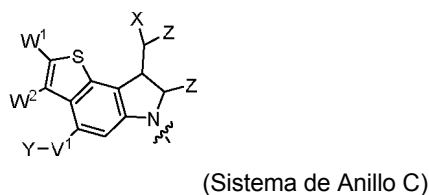
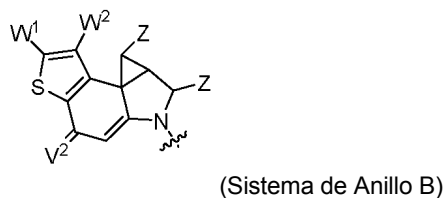
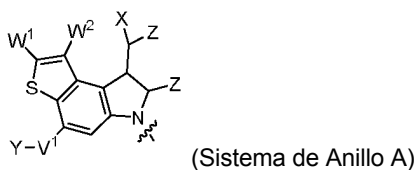
o una sal farmacéuticamente aceptable o solvato de los mismos, en la que:

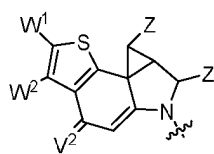
- 15 P es:

F¹-L¹-T-L²-F²

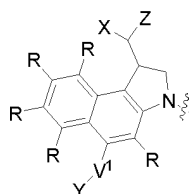
en la que:

cada uno de F^1 y F^2 se selecciona independientemente entre los sistemas de anillo A, B, C, D, E, F, G y H:

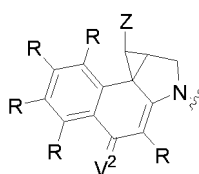




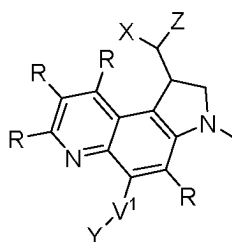
(Sistema de Anillo D)



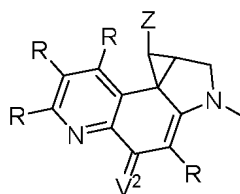
(Sistema de Anillo E)



(Sistema de Anillo F);



(Sistema de Anillo G)



(Sistema de Anillo H)

5

donde:

al menos uno de los sistemas de anillo A, B, C y D está presente;

10

cada R se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H, -alquilo C₁-C₂₀, -alquenilo C₂-C₆, -alquinilo C₂-C₆, halo, deuterio, hidroxilo, alcoxi, -NH₂, -NH(alquilo C₁-C₈), -N(alquilo C₁-C₈)₂, -NO₂, -arilo C₆-C₁₄ y -heteroarilo C₆-C₁₄, en los que dos o más R se unen opcionalmente para formar un anillo o anillos, y en los que dicho -arilo C₆-C₁₄ y -heteroarilo C₆-C₁₄ están opcionalmente sustituidos con 1 a 5 sustituyentes seleccionados independientemente entre -alquilo C₁-C₁₀, -alcoxi C₁-C₁₀, -halo, -alquiltio C₁-C₁₀, -trifluorometilo, -NH₂, -NH(alquilo C₁-C₈), -N(alquilo C₁-C₈)₂, -alquil C₁-C₁₀-N(alquilo C₁-C₈)₂, -alquiltio C₁-C₃, -NO₂ o -heterociclilo C₁-C₁₀, para cada sistema de anillo en el que aparece R;

15

cada V¹ es independientemente un enlace, O, N(R) o S, para cada sistema de anillo en el que aparece V¹;

cada V² es independientemente O, N(R) o S, para cada sistema de anillo en el que aparece V²;

cada uno de W¹ y W² es independientemente H, -alquilo C₁-C₅, -fenilo, -C(O)OR, -C(O)SR, -C(O)NHN(R)₂ o -C(O)N(R)₂ para cada sistema de anillo en el que aparecen W¹ y W²;

20

cada X se selecciona independientemente entre -OH, -O-acilo, azido, halo, cianato, tiocianato, isocianato, tioisocianato, o

cada Y se selecciona independientemente entre un enlace, H, -C(O)R^A, -C(S)R^A, -C(O)OR^A, S(O)₂OR^A, -C(O)N(R^A)₂, -C(S)N(R^A)₂, un carbohidrato tal como glicosilo, -NO₂, -P(O)(OR^A)₂, un aminoácido y un péptido (en particular un péptido que se escinde con proteasas tales como catepsinas y metaloproteinasas de matriz) para cada sistema de anillo en el que aparece Y, en el que cada R^A se selecciona independientemente entre H, -alquilo C₁-C₂₀, -heteroalquilo C₁-C₈, -arilo C₆-C₁₄, aralquilo, -heterociclilo C₁-C₁₀, -carbociclilo C₃-C₈, -alquil C₁-C₂₀N(R)₂, -alquilenilo C₁-C₂₀, -heteroalquilenilo C₁-C₈, -arilenilo C₆-C₁₄, aralquilenilo, -heterociclo C₁-C₁₀, -carbociclo C₃-C₈ y -alquil C₁-C₂₀N(R)-, y R^F donde dicho R^A está opcionalmente sustituido con 1 a 3 sustituyentes seleccionados independientemente entre R, y en el que un Y es divalente y está unido a L.

cada Z se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H, -alquilo C₁-C₈, -heteroalquilo C₁-C₈, -arilo C₆-C₁₄, -aralquilo, -heterociclilo C₁-C₁₀, -carbociclilo C₃-C₈, -C(O)Oalquilo C₁-C₈, -C(O)N(alquilo C₁-C₈)₂, -C(O)OH, -C(O)NHNH₂ y -C(O)-halo, y en el que dichos alquilo C₁-C₈, -heteroalquilo C₁-C₈, -arilo C₆-C₁₄, -aralquilo, -heterociclilo C₁-C₁₀, -carbociclilo C₃-C₈, -C(O)Oalquilo C₁-C₈, -C(O)N(alquilo C₁-C₈)₂, -C(O)OH, -C(O)NHNH₂ y -C(O)-halo están cada uno opcionalmente sustituido con 1 a 3 sustituyentes seleccionados independientemente entre R, para cada sistema de anillo en el que aparece Z;

The figure displays 15 chemical scaffolds, labeled U1 through U15, which are used in the synthesis of 15-mercaptopyridine derivatives. The scaffolds are arranged in three rows:

- Row 1:** U1 (4-substituted benzene), U2 (4-substituted benzene with a vinyl group), U3 (indole), and a 1-methoxy-2-hydroxy-3-substituted benzene derivative.
- Row 2:** A 4-methoxy-5-hydroxy-6-substituted indole derivative, U4 (a 5-membered ring with a nitrogen and a substituent), U5 (a 1,2-dicarbonyl-substituted benzene), and a 2-substituted pyridine.
- Row 3:** A 2-substituted quinoline, U6 (a 5-membered ring with a nitrogen and a substituent), U7 (a 1,2-dicarbonyl-substituted benzene), U8 (a 1,2-dicarbonyl-substituted benzene with a substituent), U9 (a 1,2-dicarbonyl-substituted benzene with a substituent), U10 (a 1,2-dicarbonyl-substituted benzene with a substituent), U11 (a 1,2-dicarbonyl-substituted benzene with a substituent), U12 (a 1,2-dicarbonyl-substituted benzene with a substituent), U13 (a 1,2-dicarbonyl-substituted benzene with a substituent), U14 (a 1,2-dicarbonyl-substituted benzene with a substituent), and U15 (a 1,2-dicarbonyl-substituted benzene with a substituent).

U³ es H, -CH₃ o -C₂H₅,

U⁴ es H o CH₃S-,

cada uno de U⁵ y U⁶ se selecciona independientemente entre H, -halo, -alquilo C₁-C₄, -alcoxi C₁-C₃, -dialquilamino C₁-C₆, -NO₂, -NHC(O)alquilo C₁-C₁₀, -OH, -NH₂, -NHC(O)NH₂, -NHC(O)CH₃ o -NHC(O)fenilo,

Q¹ es -O-, -S- o -NH-, y

5 cada uno de Q² y Q³ es independientemente -CH- o -N-;

T se selecciona entre:

-NHC(O)-,

-C(O)NH-,

-C(O)O-,

10 -OC(O)-,

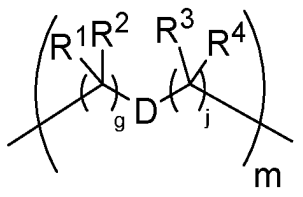
-NR^B-T¹-NR^C- donde cada uno de R^B y R^C es independientemente H o -alquilo C₁-C₈, o R^B y R^C juntos se unen para formar un anillo y juntos son (CH₂)₂₋₃, donde T¹ se selecciona entre el grupo que consiste en -C(O)-, -C(O)(CH₂)_nC(O)- donde n es un número entero de 0 a 50 y -C(O)PhC(O)- donde Ph es 1,3- o 1,4-fenileno, y donde T¹ está opcionalmente sustituido con 1-2 R,

15 -C(O)hetC(O)- en el que het es un heteroarilo mono-, bi- o tricíclico de 5 a 12 miembros, que contiene uno, dos o tres heteroátomos seleccionados independientemente entre O, N, S, P y B, donde het está opcionalmente sustituido con 1 a 8 sustituyentes, cada uno seleccionado independientemente entre el grupo que consiste en -alquilo C₁-C₈, -heteroalquilo C₁-C₈, -arilo C₆-C₁₄, -aralquilo, -heterociclilo C₁-C₁₀, -carbociclilo C₃-C₈, -NH₂, -NHR^D y -NO₂, y dichos sustituyentes opcionales en het están opcionalmente sustituidos con R^E,

20 en el que cada R^D se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H, -alquilo C₁-C₈, -C(O)-alquilo C₁-C₈, -heteroalquilo C₁-C₈, -arilo C₆-C₁₄, -aralquilo, -heterociclilo C₁-C₁₀, -carbociclilo C₃-C₈, -C(O)Oalquilo C₁-C₈, -C(O)N(alquilo C₁-C₈)₂ y -C(O)-halo, opcionalmente sustituido con R^E,

25 en el que cada R^E se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H, -alquilo C₁-C₈, -heteroalquilo C₁-C₈, -arilo, -aralquilo, -heterociclilo C₁-C₁₀, -carbociclilo C₃-C₈, -C(O)Oalquilo C₁-C₈, -C(O)N(alquilo C₁-C₈)₂ y -C(O)-halo, y en el que cada R^E está opcionalmente sustituido con 1 a 3 sustituyentes seleccionados independientemente entre R,

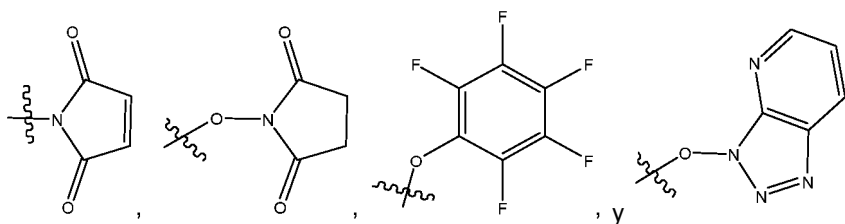
-C(A¹)X¹-T²-X¹C(B¹)-, donde T² es:



30 en el que cada X¹ es independientemente un enlace, -NR^E-, -O- o -S-, en el que cada uno de A¹ y B¹ es independientemente =O o =S, en el que cada uno de R¹, R², R³ y R⁴ es independientemente R^E o R¹ y R² forman un sistema de anillo, o R³ y R⁴ forman un sistema de anillo, o ambos R¹ y R², y R³ y R⁴, forman cada uno independientemente sistemas de anillo, o R¹ y R³ forman un sistema de anillo, o R² y R⁴ forman un sistema de anillo, o ambos R¹ y R³, y R² y R⁴, forman cada uno independientemente sistemas de anillo, donde dichos sistemas de anillo se seleccionan independientemente entre -heterociclilo C₁-C₁₀ o -carbociclilo C₃-C₈, o cada uno de R¹, R², R³ y R⁴ es un enlace a diferentes carbonos en D, en el que cada uno de g y j es independientemente un número entero de 0 a 50 y m es un número entero de 1 a 50, y en el que D es un enlace o se selecciona entre el grupo que consiste en -S-, -alquileno C₁-C₈-, -arileno C₆-C₁₄-, -heteroarileno C₆-C₁₄-, -heteroalquileno C₁-C₈-, -aralquileno, -heterociclo C₁-C₁₀ y -carbociclo C₃-C₈, donde dichos -alquileno C₁-C₈-, -arileno C₆-C₁₄-, -heteroarileno C₆-C₁₄-, -heteroalquileno C₁-C₈-, -aralquileno, -heterociclo C₁-C₁₀ y -carbociclo C₃-C₈ están opcionalmente sustituidos con -R^E, -C(O)R^E, -C(O)OR^E, -N(R^E)₂, -N(R)C(O)R^E o -N(R)C(O)OR^E, y D está opcionalmente sustituido adicionalmente con 1 a 2 R, y

-G¹-T²-G²-, donde cada uno de G¹ y G² es independientemente -S(O)X¹- o -S(O)₂X¹-;

45 L es L^A-L^B-(L^C)₁₋₃, en el que L^A se selecciona entre el grupo que consiste en -halo, -N(R)₂, -CON(R)₂, -S-arilo opcionalmente sustituido con -NO₂ o -CON(R)₂, -S-heteroarilo opcionalmente sustituido con -NO₂, alquil-SO₂-heteroarilo, arilSO₂-heteroaril-,

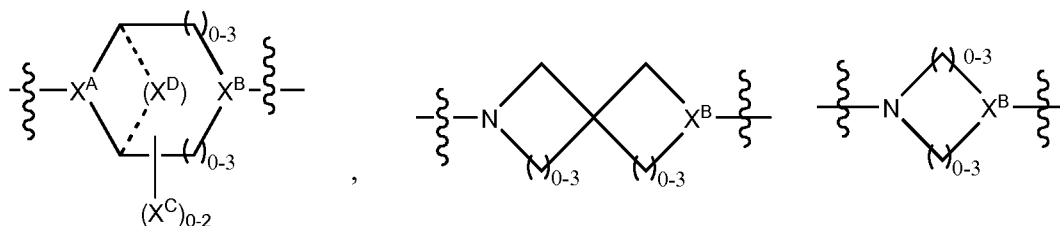


L^B es L^{B1} - L^{B2} - L^{B3} en el que L^{B1} está ausente o es uno o más componentes seleccionados entre el grupo que consiste en -C(O)-, -C(S)-, -C(O)NR-, -C(O)alquil C_1 - C_6 -, -C(O)NRalquil C_1 - C_6 -, -alquil C_1 - C_6 (OCH₂CH₂)₁₋₆-, -C(O)alquil C_1 - C_6 NRC(O)-, -C(O)alquil C_1 - C_6 (OCH₂CH₂)₁₋₆-, -alquil C_1 - C_6 (OCH₂CH₂)₁₋₆-C(O)-, -alquil C_1 - C_6 -S-S-alquil C_1 - C_6 NRC(O)CH₂-, -alquil C_1 - C_6 (OCH₂CH₂)₁₋₆NRC(O)CH₂-, -C(O)alquil C_1 - C_6 -NRC(O)alquil C_1 - C_6 -, -N=CR-fenil-O-alquil C_1 - C_6 -, -N=CR-fenil-O-alquil C_1 - C_6 -C(O)-, -C(O)-alquil C_1 - C_6 (OCH₂CH₂)₁₋₆NRC(O)-, -C(O)alquil C_1 - C_6 -fenil(NR-C(O)alquil C_1 - C_6)₁₋₄-, -C(O)alquil C_1 - C_6 (OCH₂CH₂)₁₋₆-NRC(O)alquil C_1 - C_6 -, -alquil C_1 - C_6 -, -S-, -C(O)-CH(NR-C(O)alquil C_1 - C_6)-alquil C_1 - C_6 - y $(-CH_2-CH_2-O-)_{1-20}$,

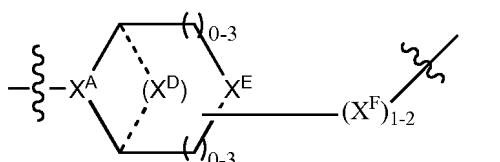
en el que L^{B2} es AA₀₋₁₂, en el que AA es un aminoácido natural, un aminoácido no natural o $-(CR^{15})_o-S-S-(CR^{15})_p$ donde cada uno de o y p es independientemente un número entero de 1 a 20,

L^{B3} es -PABA-, -PABC-, -C(O)(CH₂)_nC(O)- o está ausente;

L^c está ausente o se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en -alquileo C_1 - C_6 -, -NRheterociclil C_3 - C_8 NR-, -NRcarbociclil C_3 - C_8 NR-, -NRalquil C_1 - C_6 NR-, -NRalquileo C_1 - C_6 -, -S-, -NR-, -NRNR-, -O(CR₂)₁₋₄S-S(CR₂)₁₋₄N(R)-, -NRalquilenofenileno C_1 - C_6 NR-, -NRalquilenofenileno C_1 - C_6 SO₂NR-, -Oalquil C_1 - C_6 S-Salquil C_1 - C_6 C(COOR)NR-, -NRC(COOR)alquil C_1 - C_6 S-Salquil C_1 - C_6 O-,



y



en el que

X^A es CR o N,

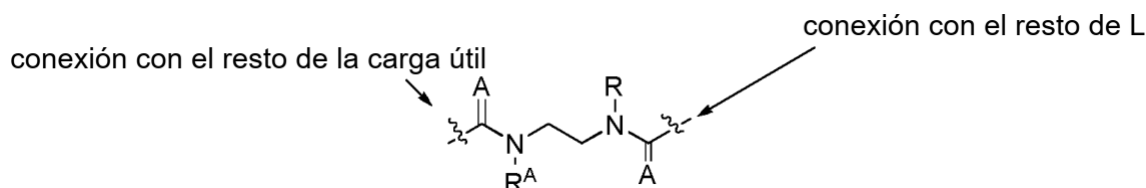
X^B es CH, CR(C(R)₂)₁₋₃NR, CR(C(R)₂)₁₋₃O, CR(C(R)₂)₁₋₃C(O)NR, CR-(C(R)₂)₁₋₃C(O)NRNR, CR(C(R)₂)₁₋₃SO₂NR, CR(C(R)₂)₁₋₃NRNR, CR(C(R)₂)₁₋₃NRC(O) o N,

cada X^C es R,

cada X^D es $-(CH_2)_{1-5}$ -, o está ausente;

X^E es O, S, C(R)₂, C(R)(C(R)₂)₁₋₃-NR₂ o NR y cada X^F es (C(R)₂)₁₋₃-NR o C(R)₂-(C(R)₂)₁₋₃-O.

En otras realizaciones de los compuestos desvelados, la variable -Y- es C(O)N(R^A)₂ o C(S)N(R^A)₂ donde un R^A es hidrógeno o -alquil C_1 - C_{20} y el otro R^A es -alquil C_1 - C_{20} -N(R)-, de tal forma que la estructura:



se forma, donde cada A es independientemente oxígeno o azufre.

De acuerdo con otro aspecto más de la invención, se proporciona un compuesto conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 3.

También se desvela un conjugado anticuerpo-fármaco de Fórmula IIIA:

5 **AB-(L-P)₁₋₂₀** (Fórmula IIIA)

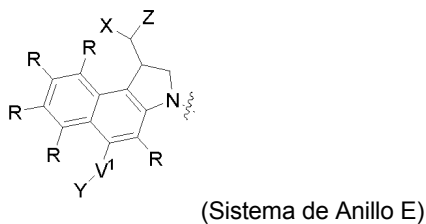
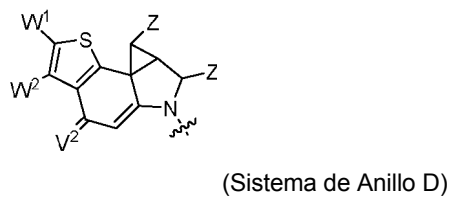
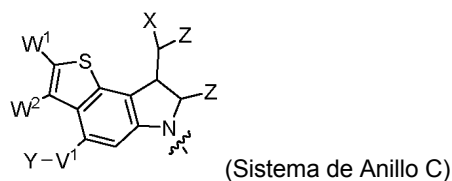
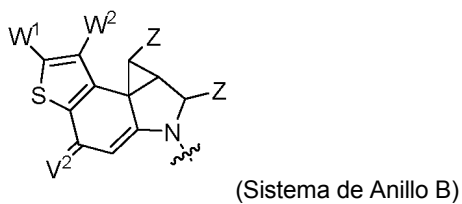
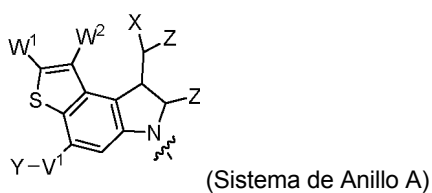
o una sal farmacéuticamente aceptable o solvato de los mismos, en la que:

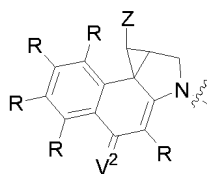
AB es un anticuerpo;

P es:

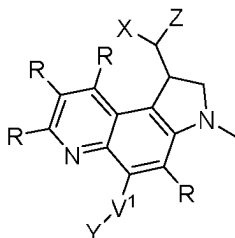
F¹-L¹-T-L²-F²

10 en la que:
cada uno de F¹ y F² se selecciona independientemente entre los sistemas de anillo A, B, C, D, E, F, G y H:

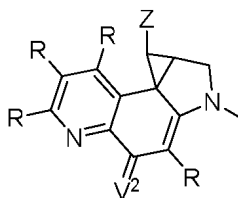




(Sistema de Anillo F);



(Sistema de Anillo G)



(Sistema de Anillo H)

donde:

5 al menos uno de los sistemas de anillo A, B, C y D está presente;

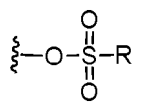
10 cada R se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H, -alquilo C₁-C₂₀, -alqueno C₂-C₃, -alquino C₂-C₃, halo, deuterio, hidroxilo, alcoxi, -NH₂, -NH(alquilo C₁-C₈), -N(alquilo C₁-C₈)₂, -NO₂, -arilo C₆-C₁₄ y -heteroarilo C₆-C₁₄, en los que dos o más R se unen opcionalmente para formar un anillo o anillos, y en los que dicho -arilo C₆-C₁₄ y -heteroarilo C₆-C₁₄ están opcionalmente sustituidos con 1 a 5 sustituyentes seleccionados independientemente entre -alquilo C₁-C₁₀, -alcoxi C₁-C₁₀, -halo, -alquilo C₁-C₁₀, -trifluorometilo, -NH₂, -NH(alquilo C₁-C₈), -N(alquilo C₁-C₈)₂, -alquil C₁-C₁₀-N(alquilo C₁-C₈)₂, -alquilo C₁-C₃, -NO₂ o -heterociclilo C₁-C₁₀, para cada sistema de anillo en el que aparece R;

cada V¹ es independientemente un enlace, O, N(R) o S, para cada sistema de anillo en el que aparece V¹;

cada V² es independientemente O, N(R) o S, para cada sistema de anillo en el que aparece V²;

15 cada uno de W¹ y W² es independientemente H, -alquilo C₁-C₅, -fenilo, -C(O)OR, -C(O)SR, -C(O)NHN(R)₂ o -C(O)N(R)₂ para cada sistema de anillo en el que aparecen W¹ y W²;

cada X se selecciona independientemente entre -OH, -O-acilo, azido, halo, cianato, tiocianato, isocianato, tioisocianato, o



20 para cada sistema de anillo en el que aparece X;

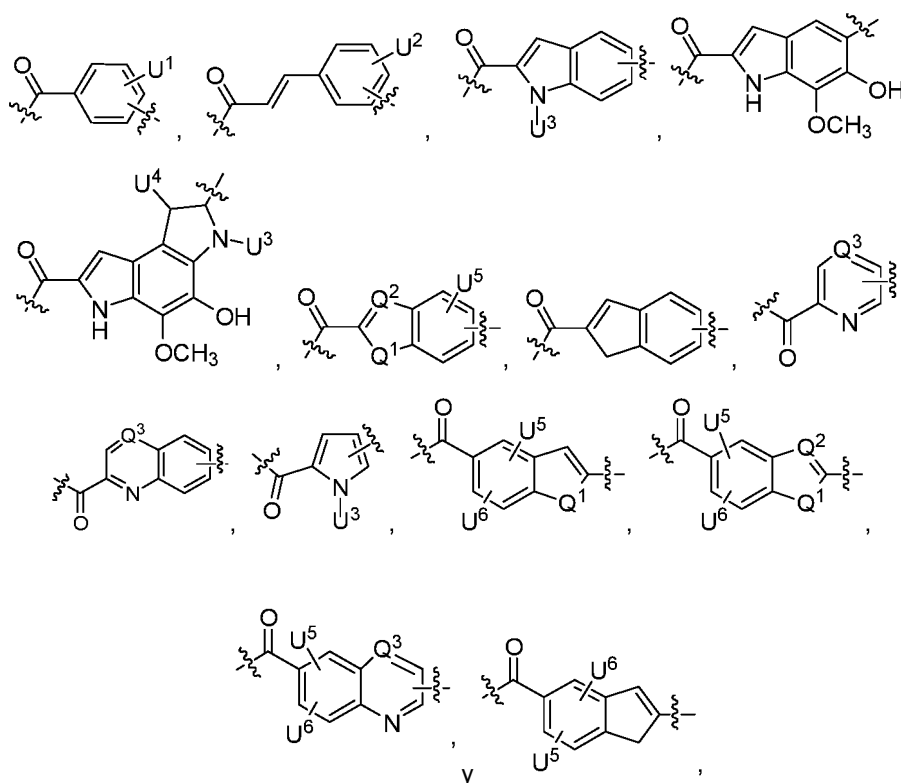
25 cada Y se selecciona independientemente entre un enlace, H, -C(O)R^A, -C(S)R^A, -C(O)OR^A, -S(O)₂OR^A, -C(O)N(R^A)₂, -C(S)N(R^A)₂, un carbohidrato tal como glicosilo, -NO₂, -P(O)(OR^A)₂, un aminoácido y un péptido (en particular un péptido que se escinde con proteasas tales como catepsinas y metaloproteinasas de matriz) para cada sistema de anillo en el que aparece Y, en el que cada R^A se selecciona independientemente entre H, -alquilo C₁-C₂₀, -heteroalquilo C₁-C₈, -arilo C₆-C₁₄, aralquilo, -heterociclilo C₁-C₁₀, -carbociclilo C₃-C₈, -alquil C₁-C₂₀N(R)₂, -alquilo C₁-C₂₀, -heteroalquilo C₁-C₈, -arileno C₆-C₁₄, aralquilo, -heterociclo C₁-C₁₀, -carbociclo C₃-C₈ y -alquil C₁-C₂₀N(R)-, y R^F donde dicho R^A está opcionalmente sustituido con 1 a 3 sustituyentes seleccionados independientemente entre R, y en el que un Y es divalente y está unido a L,

30 R^F es -N(R⁶)QN(R⁵)C(O)- y está unido a L en el carbonilo adyacente N(R⁵), en el que cada uno de R⁵ y R⁶ se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H, -alquilo C₁-C₈, -heteroalquilo C₁-C₈, -arilo C₆-

C₁₄, -aralkilo, -heterociclilo C₁-C₁₀ y -carbociclilo C₃-C₈, o R⁵ o R⁶ se unen con un carbono sustituido en Q para formar un anillo -heterocíclico C₁-C₁₀ o -heteroarilo C₆-C₁₄, o R⁵ y R⁶ se unen para formar un sistema de anillo -heterocíclico C₁-C₁₀ o -heteroarilo C₆-C₁₄, y donde Q es -alquileo C₁-C₈, -heteroalquileo C₁-C₈, -arileno C₆-C₁₄, -aralkileno-, -heterociclo C₁-C₁₀- o -carbociclo C₃-C₈-, en el que cada uno de Q, R⁵ y R⁶ está opcionalmente sustituido independientemente con 1 a 3 sustituyentes seleccionados independientemente entre R;

cada Z se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H, -alquilo C₁-C₈, -heteroalquilo C₁-C₈, -arilo C₆-C₁₄, -aralkilo, -heterociclilo C₁-C₁₀, -carbociclilo C₃-C₈, -C(O)Oalquilo C₁-C₈, -C(O)N(alquilo C₁-C₈)₂, -C(O)OH, -C(O)NHNH₂ y -C(O)-halo, y en el que dichos alquilo C₁-C₈, -heteroalquilo C₁-C₈, -arilo C₆-C₁₄, -aralkilo, -heterociclilo C₁-C₁₀, -carbociclilo C₃-C₈, -C(O)Oalquilo C₁-C₈, -C(O)N(alquilo C₁-C₈)₂, -C(O)OH, -C(O)NHNH₂ y -C(O)-halo están cada uno opcionalmente sustituido con 1 a 3 sustituyentes seleccionados independientemente entre R, para cada sistema de anillo en el que aparece Z;

cada uno de L¹ y L² se selecciona independientemente entre un enlace directo, carbonilo o un grupo carbonil acilo unido a F¹ o F² en el resto acilo, donde el grupo carbonil acilo se selecciona entre el grupo que consiste en:



en el que

U¹ se selecciona entre H, -CH₃, -OH, -OCH₃, -NO₂, -NH₂, -NHNHAc, -NHNHC(O)CH₃, -NHC(O)fenilo o -halo, U² es H, -OH o -OCH₃,

U³ es H, -CH₃ o -C₂H₅,

U⁴ es H o CH₃S-,

cada uno de U⁵ y U⁶ se selecciona independientemente entre H, -halo, -alquilo C₁-C₄, -alcoxi C₁-C₃, -dialquilamino C₁-C₆, -NO₂, -NHC(O)alquilo C₁-C₁₀, -OH, -NH₂, -NHC(O)NH₂, -NHC(O)CH₃ o -NHC(O)fenilo,

Q¹ es -O-, -S- o -NH-,

cada uno de Q² y Q³ es independientemente -CH- o -N-;

T se selecciona entre:

-NHC(O)-,

-C(O)NH-,

-C(O)O-,

-OC(O)-,

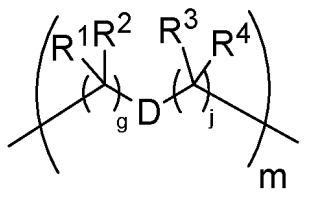
-NR^B-T¹-NR^C- donde cada uno de R^B y R^C es independientemente H o -alquilo C₁-C₈, o R^B y R^C juntos se unen para formar un anillo y juntos son (CH₂)₂₋₃, donde T¹ se selecciona entre el grupo que consiste en -C(O)-, -C(O)(CH₂)_nC(O)- donde n es un número entero de 0 a 50 y -C(O)PhC(O)- donde Ph es 1,3- o 1,4-fenileno, y donde T¹ está opcionalmente sustituido con 1-2 R,

-C(O)hetC(O)- en el que het es un heteroarilo mono-, bi- o tricíclico de 5 a 12 miembros, que contiene uno, dos o tres heteroátomos seleccionados independientemente entre O, N, S, P y B, donde het está opcionalmente sustituido con 1 a 8 sustituyentes, cada uno seleccionado independientemente entre el grupo que consiste en -alquilo C₁-C₈, -heteroalquilo C₁-C₈, -arilo C₆-C₁₄, -aralquilo, -heterociclilo C₁-C₁₀, -carbociclilo C₃-C₈, -NH₂, -NHR^D y -NO₂, y dichos sustituyentes opcionales en het están opcionalmente sustituidos con R^E,

en el que cada R^D se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H o -alquilo C₁-C₈, -C(O)-alquilo C₁-C₈, -heteroalquilo C₁-C₈, -arilo C₆-C₁₄, -aralquilo, -heterociclilo C₁-C₁₀, -carbociclilo C₃-C₈, -C(O)Oalquilo C₁-C₈, -C(O)N(alquilo C₁-C₈)₂ y -C(O)-halo, opcionalmente sustituido con R^E,

en el que cada R^E se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H, -alquilo C₁-C₈, -heteroalquilo C₁-C₈, -arilo, -aralquilo, -heterociclilo C₁-C₁₀, -carbociclilo C₃-C₈, -C(O)Oalquilo C₁-C₈, -C(O)N(alquilo C₁-C₈)₂ y -C(O)-halo, y en el que cada R^E está opcionalmente sustituido con 1 a 3 sustituyentes seleccionados independientemente entre R,

-C(A¹)X¹-T²-X¹C(B¹)-, donde T² es:

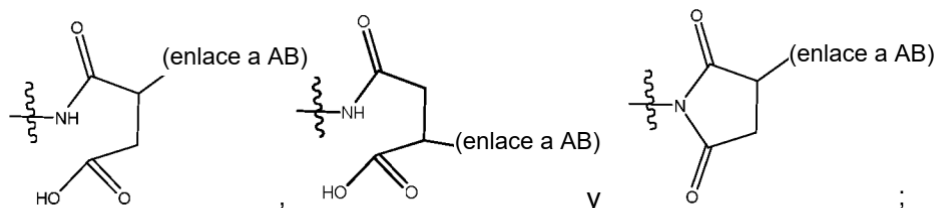


en el que cada X¹ es independientemente un enlace, -NR^E-, -O- o -S-, en el que cada uno de A¹ y B¹ es independientemente =O o =S, en el que cada uno de R¹, R², R³ y R⁴ es independientemente R^E o R¹ y R² forman un sistema de anillo, o R³ y R⁴ forman un sistema de anillo, o ambos R¹ y R², y R³ y R⁴, forman cada uno independientemente sistemas de anillo, o R¹ y R³ forman un sistema de anillo, o R² y R⁴ forman un sistema de anillo, o ambos R¹ y R³, y R² y R⁴, forman cada uno independientemente sistemas de anillo, donde dichos sistemas de anillo se seleccionan independientemente entre -heterociclilo C₁-C₁₀ o -carbociclilo C₃-C₈, o cada uno de R¹, R², R³ y R⁴ es un enlace a diferentes carbonos en D, en el que cada uno de g y j es independientemente un número entero de 0 a 50 y m es un número entero de 1 a 50, y en el que D es un enlace o se selecciona entre el grupo que consiste en -S-, -alquilenos C₁-C₈-, -arilenos C₆-C₁₄-, -heteroarilenos C₆-C₁₄-, -heteroalquilenos C₁-C₈-, -aralquilenos, -heterociclos C₁-C₁₀ y -carbociclos C₃-C₈, donde dichos -alquilenos C₁-C₈-, -arilenos C₆-C₁₄-, -heteroarilenos C₆-C₁₄-, -heteroalquilenos C₁-C₈-, -aralquilenos, -heterociclos C₁-C₁₀ y -carbociclos C₃-C₈ están opcionalmente sustituidos con -R^E-, -C(O)R^E-, -C(O)OR^E-, -N(R^E)₂-, -N(R)C(O)R^E o -N(R)C(O)OR^E, y D está opcionalmente sustituido adicionalmente con 1 a 2 R, y

-G¹-T²-G²-, donde cada uno de G¹ y G² es independientemente -S(O)X¹- o -S(O)₂X¹-;

L es L^A-L^B-(L^C)₁₋₃;

L^A se selecciona entre: un enlace a AB, -NR-(enlace a AB), -heteroaril-(enlace a AB),



L^B es L^{B1}-L^{B2}-L^{B3} en el que L^{B1} está ausente o es uno o más componentes seleccionados entre el grupo que consiste en -C(O)-, -C(S)-, -C(O)NR-, -C(O)alquil C₁-C₆-, -C(O)NRalquil C₁-C₆-, -alquil C₁-

$C_6(OCH_2CH_2)_{1-6}$ -, $-C(O)alquil$ $C_1-C_6NRC(O)-$ -, $-C(O)alquil$ $C_1-C_6(OCH_2CH_2)_{1-6}$ -, $-alquil$ $C_1-C_6(OCH_2CH_2)_{1-6}-C(O)-$ -, $-alquil$ $C_1-C_6-S-S-alquil$ $C_1-C_6NRC(O)CH_2-$ -, $-alquil$ $C_1-C_6(OCH_2CH_2)_{1-6}NRC(O)CH_2-$ -, $-C(O)alquil$ C_1-C_6-

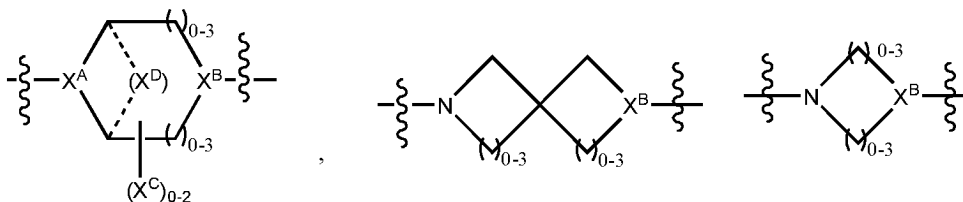
5 $NRC(O)alquil$ C_{1-6} -, $-N=CR-fenil-O-alquil$ C_1-C_6- -, $-N=CR-fenil-O-alquil$ $C_1-C_6-C(O)-$ -, $-C(O)-alquil$ $C_1-C_6(OCH_2CH_2)_{1-6}NRC(O)-$ -,

$-C(O)alquil$ $C_1-C_6-fenil(NR-C(O)alquil$ $C_1-C_6)_{1-4}$ -, $-C(O)alquil$ $C_1-C_6(OCH_2CH_2)_{1-6}-NRC(O)alquil$ C_1-C_6- -,
 $-alquil$ C_1-C_6- -, $-S-$ -, $-C(O)-CH(NR-C(O)alquil$ $C_1-C_6)-alquil$ C_1-C_6- y $(-CH_2-CH_2-O-)_{1-20}$;

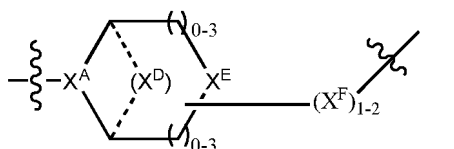
10 L^{B2} es AA_{0-12} , en el que AA es un aminoácido natural, un aminoácido no natural o $-(CR^{15})_o-S-S-(CR^{15})_p$ donde cada uno de o y p es independientemente un número entero de 1 a 20,

L^{B3} es $-PABA-$ -, $-PABC-$ -, $-C(O)(CH_2)_nC(O)-$ o está ausente;

15 L^c está ausente o se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en $-alquileo$ C_1-C_6- -, $NRheterocicil$ C_3-C_8NR- -, $NRcarbocicil$ C_3-C_8NR- -, $NRalquil$ C_1-C_6NR- -, $NRalquileo$ C_1-C_6- -, $-S-$ -, $-NR-$ -, $-NRNR-$ -, $-O(CR_2)_{1-4}S-S(CR_2)_{1-4}N(R)-$ -, $-NR-alquileo$ C_1-C_6NR- -, $-NRalquileo$ C_1-C_6NR- -, $-NRalquileo$ $C_1-C_6SO_2NR-$ -, $-Oalquil$ $C_1-C_6S-Salquil$ $C_1-C_6C(COOR)NR-$ -, $-NRC(COOR)alquil$ $C_1-C_6S-Salquil$ C_1-C_6O- -,



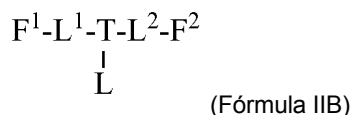
y



en el que

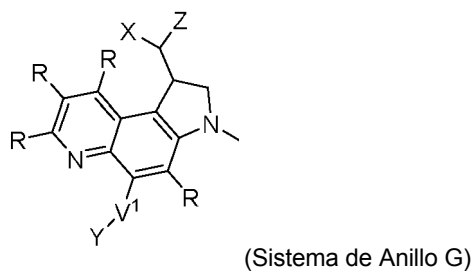
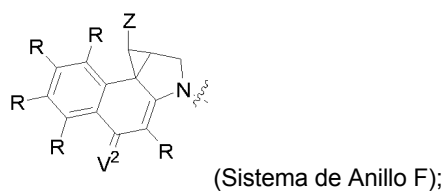
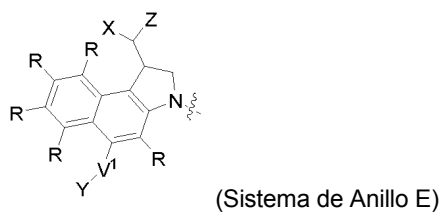
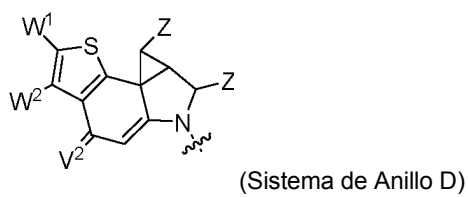
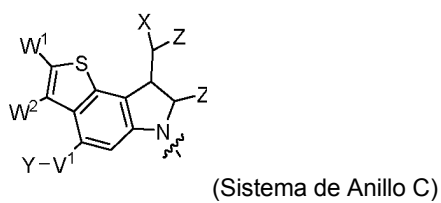
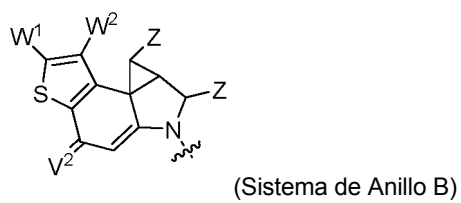
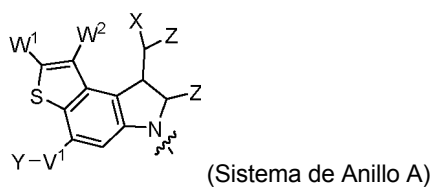
20 X^A es CR o N ,
 X^B es CH , $CR(C(R)_2)_{1-3}NR$, $CR(C(R)_2)_{1-3}O$, $CR(C(R)_2)_{1-3}C(O)NR$, $CR-(C(R)_2)_{1-3}C(O)NRNR$,
 $CR(C(R)_2)_{1-3}SO_2NR$, $CR(C(R)_2)_{1-3}NRNR$, $CR(C(R)_2)_{1-3}NRC(O)$ o N , cada X^C es R ;
 cada X^D es $-(CH_2)_{1-5}$ -, o está ausente;
 25 X^E es O , S , $C(R)_2$, $C(R)(C(R)_2)_{1-3}-NR_2$ o NR , y
 cada X^F es $(C(R)_2)_{1-3}-NR$ o $C(R)_2-(C(R)_2)_{1-3}-O$.

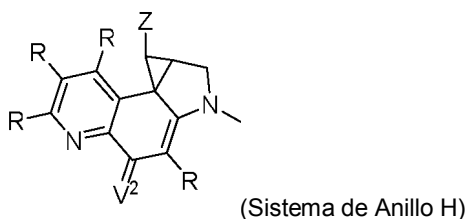
También se desvela un compuesto "enlazador-carga útil" de Fórmula IIB:



o una sal farmacéuticamente aceptable o solvato de los mismos, en la que:

cada uno de F^1 y F^2 se selecciona independientemente entre los sistemas de anillo A, B, C, D, E, F, G y H:





donde:

al menos uno de los sistemas de anillo A, B, C y D está presente;

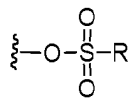
cada R se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H, -alquilo C₁-C₂₀, -alqueno C₂-C₆, -alquino C₂-C₃, halo, deuterio, hidroxilo, alcoxi, -NH₂, -NH(alquilo C₁-C₈), -N(alquilo C₁-C₈)₂, -NO₂, -arilo C₆-C₁₄ y -heteroarilo C₆-C₁₄, en los que dos o más R se unen opcionalmente para formar un anillo o anillos, y en los que dicho -arilo C₆-C₁₄ y -heteroarilo C₆-C₁₄ están opcionalmente sustituidos con 1 a 5 sustituyentes seleccionados independientemente entre -alquilo C₁-C₁₀, -alcoxi C₁-C₁₀, -halo, -alquiltio C₁-C₁₀, -trifluorometilo, -NH₂, -NH(alquilo C₁-C₈), -N(alquilo C₁-C₈)₂, -alquil C₁-C₁₀-N(alquilo C₁-C₈)₂, -alquiltio C₁-C₃, -NO₂ o -heterociclilo C₁-C₁₀, para cada sistema de anillo en el que aparece R;

cada V¹ es independientemente un enlace, O, N(R) o S, para cada sistema de anillo en el que aparece V¹;

cada V² es independientemente O, N(R) o S, para cada sistema de anillo en el que aparece V²;

cada uno de W¹ y W² es independientemente H, -alquilo C₁-C₅, -fenilo, -C(O)OR, -C(OSR), -C(O)NHN(R)₂ o -C(O)N(R)₂ para cada sistema de anillo en el que aparecen W¹ y W²;

cada X es independientemente -OH, -O-acilo, azido, halo, cianato, tiocianato, isocianato, tioisocianato, o

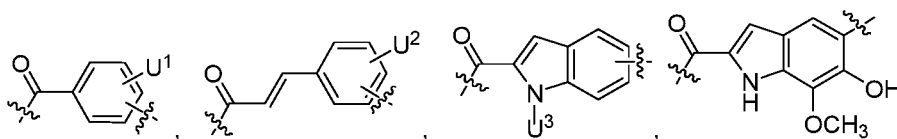


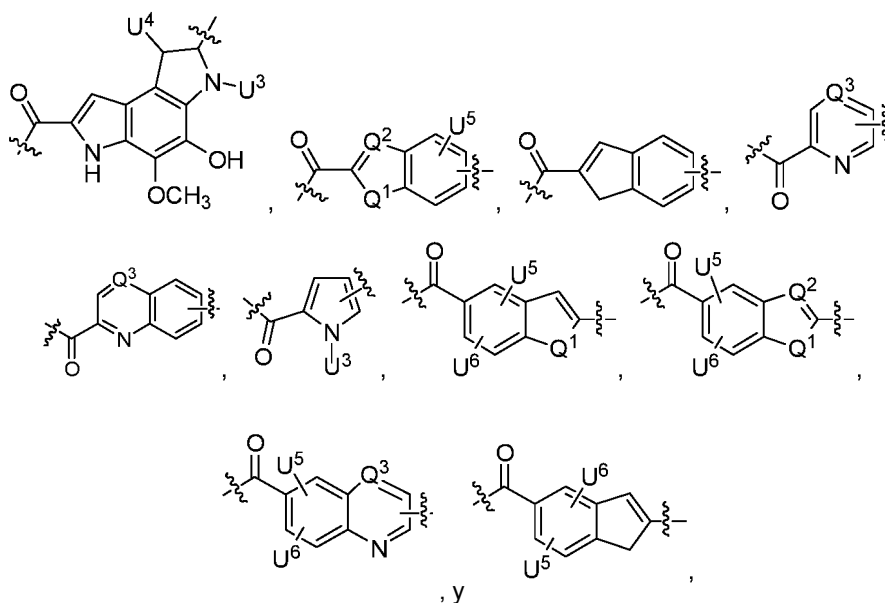
para cada sistema de anillo en el que aparece X;

cada Y se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H, -alquil C₁-C₆-R^A, -C(O)R^A, -C(S)R^A, -C(O)OR^A, -S(O)₂OR^A, -C(O)N(R^A)₂, -C(S)N(R^A)₂, un carbohidrato tal como glicosilo, -NO₂, -PO(OR^A)₂, un aminoácido y un péptido (en particular un péptido que se escinde con proteasas tales como catepsinas y metaloproteinasas de matriz) para cada sistema de anillo en el que aparece Y, en el que cada R^A se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H, -alquilo C₁-C₂₀, -heteroalquilo C₁-C₈, -arilo C₆-C₁₄, -aralquilo, -heterociclilo C₁-C₁₀, -carbociclilo C₃-C₈ y -alquil C₁-C₂₀N(R)₂, en el que dichos alquilo C₁-C₂₀, -heteroalquilo C₁-C₈, -arilo C₆-C₁₄, -aralquilo, -heterociclilo C₁-C₁₀, -carbociclilo C₃-C₈ y -alquil C₁-C₂₀N(R)₂ están opcionalmente sustituidos con 1 a 3 sustituyentes seleccionados independientemente entre R;

cada Z se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H, -alquilo C₁-C₈, -heteroalquilo C₁-C₈, -arilo C₆-C₁₄, -aralquilo, -heterociclilo C₁-C₁₀, -carbociclilo C₃-C₈, -C(O)Oalquilo C₁-C₈, -C(O)N(alquilo C₁-C₈)₂, -C(O)OH, -C(O)NHNH₂ y -C(O)-halo, y en el que dichos alquilo C₁-C₈, -heteroalquilo C₁-C₈, -arilo C₆-C₁₄, -aralquilo, -heterociclilo C₁-C₁₀, -carbociclilo C₃-C₈, -C(O)Oalquilo C₁-C₈, -C(O)N(alquilo C₁-C₈)₂, -C(O)OH, -C(O)NHNH₂ y -C(O)-halo están cada uno opcionalmente sustituido con 1 a 3 sustituyentes seleccionados independientemente entre R, para cada sistema de anillo en el que aparece Z;

cada uno de L¹ y L² se selecciona independientemente entre un enlace directo, carbonilo o un grupo carbonil acilo unido a F¹ o F² en el resto acilo, donde el grupo carbonil acilo se selecciona entre el grupo que consiste en:





en el que

5 U¹ se selecciona entre H, -CH₃, -OH, -OCH₃, -NO₂, -NH₂, -NHNHAc, -NHNHC(O)CH₃, -NH-C(O)fenilo o -halo,

U² es H, -OH o -OCH₃,

U³ es H, -CH₃ o -C₂H₅,

U⁴ es H o CH₃S-,

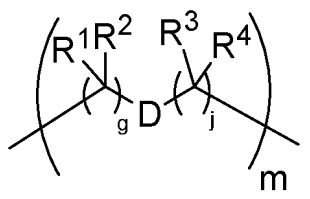
10 cada uno de U⁵ y U⁶ se selecciona independientemente entre H, -halo, -alquilo C₁-C₄, -alcoxi C₁-C₃, -dialquilamino C₁-C₆, -NO₂, -NHC(O)alquilo C₁-C₁₀, -OH, -NH₂, -NHC(O)NH₂, -NHC(O)CH₃ o -NHC(O)fenilo,

Q¹ es -O-, -S- o -NH-, y

cada uno de Q² y Q³ es independientemente -CH- o -N-;

T se selecciona entre:

-C(A¹)X¹-T²-X¹C(B¹)-, donde T² es:



15 en el que cada X¹ es independientemente un enlace, -NR^E-, -O- o -S-, en el que cada uno de A¹ and B¹ es independientemente =O o =S, en el que cada uno de R¹, R², R³, y R⁴ es independientemente R^E, o R¹ y R² forman un sistema de anillo, o R³ y R⁴ forman un sistema de anillo, o ambos R¹ y R², y R³ y R⁴ forman cada uno independientemente sistemas de anillo, o R¹ y R³ forman un sistema de anillo, o R² y R⁴ forman un sistema de anillo, o ambos R¹ y R³, y R² y R⁴ forman cada uno sistemas de anillo, donde los sistemas de anillo se seleccionan independientemente entre -heterociclilo C₁-C₁₀ o -carbociclilo C₃-C₈, o cada uno de R¹, R², R³ y R⁴ es un enlace a diferentes carbonos en D, en el que cada g y j es independientemente un número entero de 0 a 50 y m es un número entero de 1 a 50, y en el que D se selecciona entre el grupo que consiste en -alquileno C₁-C₈-, -arileno C₆-C₁₄-, -heteroarileno C₆-C₁₄-, -heteroalquileno C₁-C₈-, -aralquileno, -heterociclo C₁-C₁₀ y -carbociclo C₃-C₈, donde dichos -alquileno C₁-C₈-, -arileno C₆-C₁₄-, -heteroarileno C₆-C₁₄-, -heteroalquileno C₁-C₈-, -aralquileno, -heterociclo C₁-C₁₀ y -carbociclo C₃-C₈ están sustituidos con un miembro del grupo seleccionado entre N(R^E)C(O)- donde el carbonilo está unido a L, y -C(O)- donde el carbonilo está unido a L, y opcionalmente sustituidos adicionalmente con 1 a 2 R;

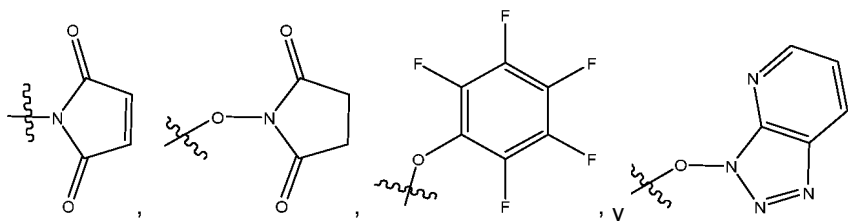
30 donde cada R^E se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H, -alquilo C₁-C₈-, -heteroalquilo C₁-C₈-, -arilo, -aralquilo, -heterociclilo C₁-C₁₀-, -carbociclilo C₃-C₈-, -C(O)Oalquilo C₁-C₈-, -C(O)N(alquilo C₁-C₈)₂ y -C(O)-halo, y en el que cada R^E está opcionalmente sustituido con 1 a 3 sustituyentes

seleccionados independientemente entre R;

L es $L^A-L^B-(L^C)_{1-3}$;

L^A se selecciona entre -halo, -N(R)₂, -CON(R)₂, -S-arilo opcionalmente sustituido con -NO₂ o -CONR₂, -S-heteroarilo opcionalmente sustituido con -NO₂, alquil-SO₂-heteroarilo, arilSO₂-heteroaril-;

5



LB es LB1-LB2-LB3

10

en el que L^{B1} está ausente o es uno o más componentes seleccionados entre el grupo que consiste en -C(O)-, -C(S)-, -C(O)NR-, -C(O)alquil C₁-C₆-, -C(O)NRalquil C₁-C₆-, -alquil C₁-C₆(OCH₂CH₂)₁₋₆-, -C(O)alquil C₁-C₆NRC(O)-, -C(O)alquil C₁-C₆(OCH₂CH₂)₁₋₆-, -alquil C₁-C₆(OCH₂CH₂)₁₋₆-C(O)-, -alquil C₁-C₆-S-S-alquil C₁-C₆NRC(O)CH₂-, -alquil C₁-C₆(OCH₂CH₂)₁₋₆NRC(O)CH₂-, -C(O)alquil C₁-C₆-NRC(O)alquil C₁-C₆-, -N=CR-fenil-O-alquil C₁-C₆-C(O)-, -C(O)-alquil C₁-C₆(OCH₂CH₂)₁₋₆NRC(O)-, -C(O)alquil C₁-C₆-fenil(NR-C(O)alquil C₁-C₆)₁₋₄-, -C(O)alquil C₁-C₆(OCH₂CH₂)₁₋₆-NRC(O)alquil C₁-C₆-, -alquil C₁-C₆-, -S-, -C(O)-CH(NR-C(O)alquil C₁-C₆)-alquil C₁-C₆- y (-CH₂-CH₂-O)₁₋₂₀;

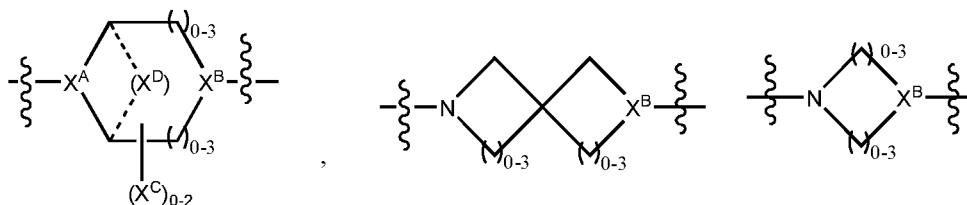
15

L^{B2} es AA₀₋₁₂, en el que AA es un aminoácido natural, un aminoácido no natural o -(CR¹⁵)_o-S-S-(CR¹⁵)_p donde cada uno de o y p es independientemente un número entero de 1 a 20,

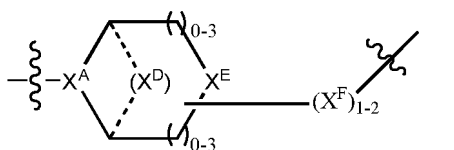
L^{B3} es -PABA-, -PABC-, -C(O)(CH₂)_nC(O)- o está ausente;

20

L^C está ausente o se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en -alquileo C₁-C₆-, -NRheterociclil C₃-C₈NR-, -NRcarbociclil C₃-C₈NR-, -NRalquil C₁-C₆NR-, -NRalquileo C₁-C₆-, -S-, -NR-, -NRNR-, -O(CR₂)₁₋₄S-S(CR₂)₁₋₄N(R)-, -NRalquilenofenileno C₁-C₆NR-, -NRalquilenofenileno C₁-C₆SO₂NR-, -Oalquil C₁-C₆S-Salquil C₁-C₆C(COOR)NR-, -NRC(COOR)alquil C₁-C₆S-Salquil C₁-C₆O-,



y



en el que

25

X^A es CR o N,

X^B es CH, CR(C(R)₂)₁₋₃NR, CR(C(R)₂)₁₋₃O, CR(C(R)₂)₁₋₃C(O)NR, CR-(C(R)₂)₁₋₃C(O)NRNR, CR(C(R)₂)₁₋₃SO₂NR, CR(C(R)₂)₁₋₃NRNR, CR(C(R)₂)₁₋₃NRC(O) o N;

cada X^C es R;

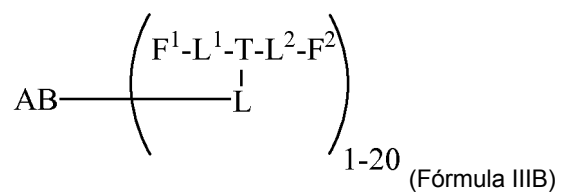
cada X^D es -(CH₂)₁₋₅-, o está ausente;

30

X^E es O, S, C(R)₂, C(R)(C(R)₂)₁₋₃-NR₂ o NR, y

cada X^F es (C(R)₂)₁₋₃-NR o C(R)₂-(C(R)₂)₁₋₃-O.

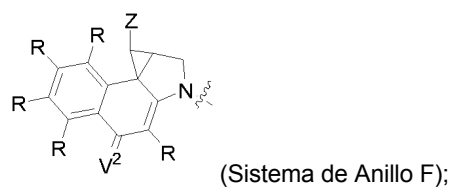
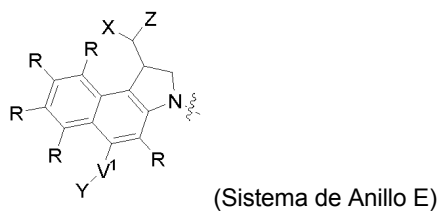
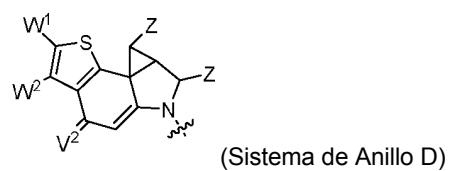
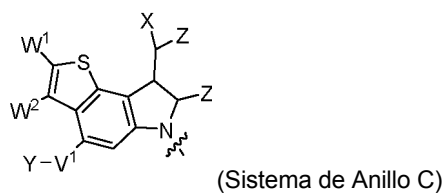
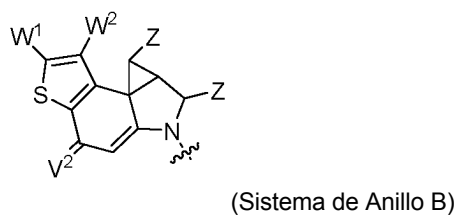
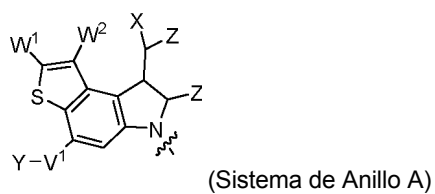
También se desvela un compuesto conjugado anticuerpo-fármaco de Fórmula IIIB:

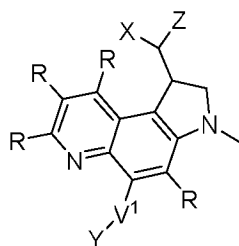


o una sal farmacéuticamente aceptable o solvato de los mismos, en la que:

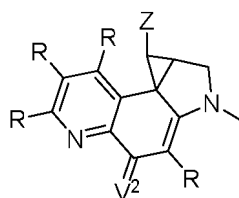
AB es un anticuerpo;

cada uno de F^1 y F^2 se selecciona independientemente entre los sistemas de anillo A, B, C, D, E, F, G y H:





(Sistema de Anillo G)



(Sistema de Anillo H)

donde:

al menos uno de los sistemas de anillo A, B, C y D está presente;

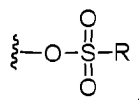
- 5 cada R se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H, -alquilo C₁-C₂₀, -alqueno C₂-C₆, -alquino C₂-C₆, halo, deuterio, hidroxilo, alcoxi, -NH₂, -NH(alquilo C₁-C₈), -N(alquilo C₁-C₈)₂, -NO₂, -arilo C₆-C₁₄ y -heteroarilo C₆-C₁₄, en los que dos o más R se unen opcionalmente para formar un anillo o anillos, y en los que dicho -arilo C₆-C₁₄ y -heteroarilo C₆-C₁₄ están opcionalmente sustituidos con 1 a 5 sustituyentes seleccionados independientemente entre -alquilo C₁-C₁₀, -alcoxi C₁-C₁₀, -halo, -alquilo C₁-C₁₀, -trifluorometilo, -NH₂, -NH(alquilo C₁-C₈), -N(alquilo C₁-C₈)₂, -alquil C₁-C₁₀-N(alquilo C₁-C₈)₂, -alquilo C₁-C₃, -NO₂ o -heterociclilo C₁-C₁₀, para cada sistema de anillo en el que aparece R;

cada V¹ es independientemente un enlace, O, N(R) o S, para cada sistema de anillo en el que aparece V¹;

cada V² es independientemente O, N(R) o S, para cada sistema de anillo en el que aparece V²;

- 15 cada uno de W¹ y W² es independientemente H, -alquilo C₁-C₅, -fenilo, -C(O)OR, -C(O)SR, -C(O)NHN(R)₂ o -C(O)N(R)₂ para cada sistema de anillo en el que aparecen W¹ y W²;

cada X es independientemente -OH, -O-acilo, azido, halo, cianato, tiocianato, isocianato, tioisocianato, o



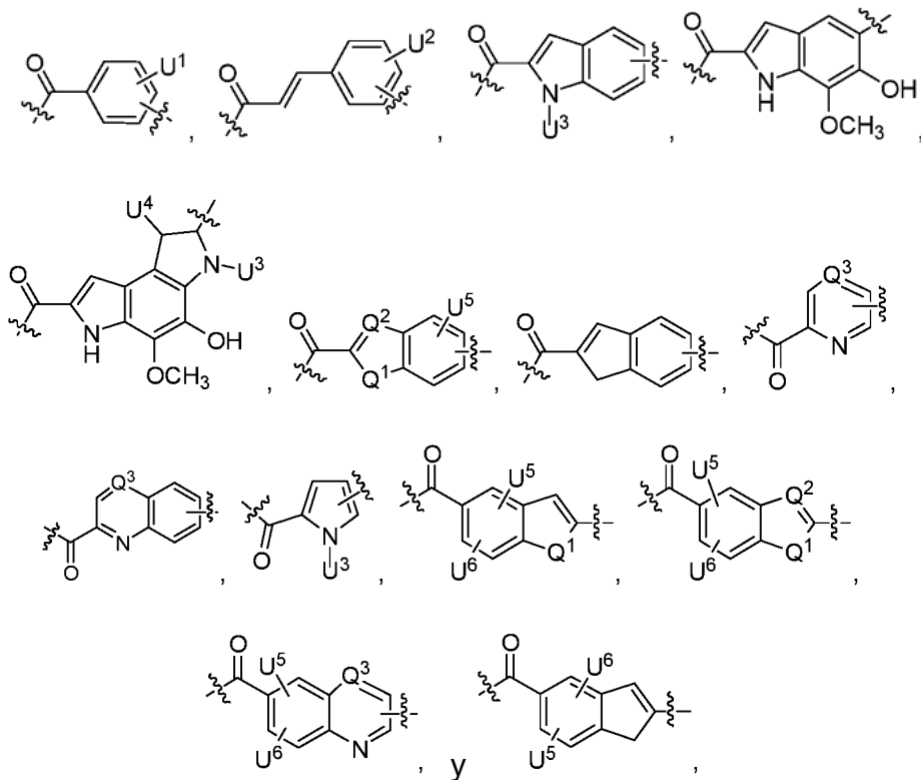
para cada sistema de anillo en el que aparece X;

- 20 cada Y se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H, -alquil C₁-C₈-R^A-C(O)R^A, -C(S)R^A, -C(O)OR^A, -S(O)₂OR^A, -C(O)N(R^A)₂, -C(S)N(R^A)₂, un carbohidrato tal como glicosilo, -NO, -PO(OR^A)₂, un aminoácido y un péptido (en particular un péptido que se escinde con proteasas tales como catepsinas y metaloproteinasas de matriz), para cada sistema de anillo en el que aparece Y, en el que cada R^A se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H, -alquilo C₁-C₂₀, -heteroalquilo C₁-C₈, -arilo C₆-C₁₄, -aralquilo, -heterociclilo C₁-C₁₀, -carbociclilo C₃-C₈ y -alquil C₁-C₂₀N(R)₂, en el que dichos alquilo C₁-C₂₀, -heteroalquilo C₁-C₈, -arilo C₆-C₁₄, -aralquilo, -heterociclilo C₁-C₁₀, -carbociclilo C₃-C₈ y -alquil C₁-C₂₀N(R)₂ están opcionalmente sustituidos con 1 a 3 sustituyentes seleccionados independientemente entre R;

- 25 cada Z se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H, -alquilo C₁-C₈, -heteroalquilo C₁-C₈, -arilo C₆-C₁₄, -aralquilo, -heterociclilo C₁-C₁₀, -carbociclilo C₃-C₈, -C(O)Oalquilo C₁-C₈, -C(O)N(alquilo C₁-C₈)₂, -C(O)OH, -C(O)NHNH₂ y -C(O)-halo, y en el que dichos alquilo C₁-C₈, -heteroalquilo C₁-C₈, -arilo C₆-C₁₄, -aralquilo, -heterociclilo C₁-C₁₀, -carbociclilo C₃-C₈, -C(O)Oalquilo C₁-C₈, -C(O)N(alquilo C₁-C₈)₂, -C(O)OH, -C(O)NHNH₂ y -C(O)-halo están cada uno opcionalmente sustituido con 1 a 3 sustituyentes seleccionados independientemente entre R, para cada sistema de anillo en el que aparece Z;

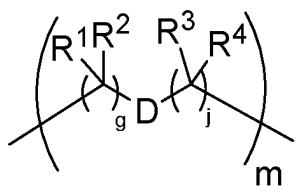
- 30 cada uno de L¹ y L² se selecciona independientemente entre un enlace directo, carbonilo o un grupo carbonil acilo unido a F¹ o F² en el resto acilo, donde el grupo carbonil acilo se selecciona entre el grupo que consiste en:

35



en el que

- 5 U¹ se selecciona entre H, -CH₃, -OH, -OCH₃, -NO₂, -NH₂, -NHNHAc, -NHNHC(O)CH₃, -NH-C(O)fenilo o -halo,
- U² es H, -OH o -OCH₃,
- U³ es H, -CH₃ o -C₂H₅,
- U⁴ es H o CH₃S-,
- 10 cada uno de U⁵ y U⁶ se selecciona independientemente entre H, -halo, -alquilo C₁-C₄, -alcoxi C₁-C₃, -dialquilamino C₁-C₈,
- NO₂, -NHC(O)alquilo C₁-C₁₀, -OH, -NH₂, -NHC(O)NH₂, -NHC(O)CH₃ o -NHC(O)fenilo,
- Q¹ es -O-, -S- o -NH-, y
- cada uno de Q² y Q³ es independientemente -CH- o -N-;
- 15 T se selecciona entre:
- C(A¹)X¹-T²-X¹C(B¹)-, donde T² es:



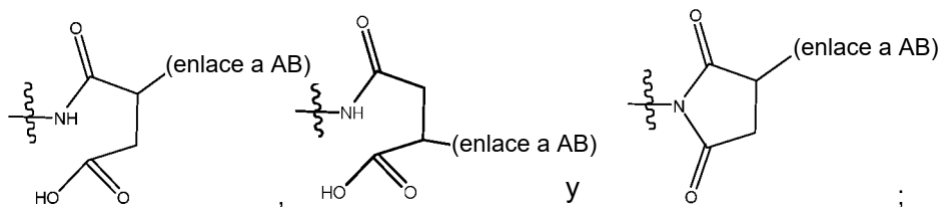
- 20 en el que cada X^1 es independientemente un enlace, $-NR^E$ -, $-O-$ o $-S-$, en el que cada uno de A^1 y B^1 es independientemente $=O$ o $=S$, en el que cada uno de R^1 , R^2 , R^3 , y R^4 es independientemente R^E , o R^1 y R^2 forman un sistema de anillo, o R^3 y R^4 forman un sistema de anillo, o ambos R^1 y R^2 , y R^3 y R^4 forman cada uno independientemente sistemas de anillo, o R^1 y R^3 forman un sistema de anillo, o R^2 y R^4 forman un

sistema de anillo, o ambos R^1 y R^3 , y R^2 y R^4 forman cada uno sistemas de anillo, donde los sistemas de anillo se seleccionan independientemente entre -heterociclilo C_1-C_{10} o -carbociclilo C_3-C_8 , o cada uno de R^1 , R^2 , R^3 y R^4 es un enlace a diferentes carbonos en D, en el que cada g y j es independientemente un número entero de 0 a 50 y m es un número entero de 1 a 50, y en el que D se selecciona entre el grupo que consiste en -alquileo C_1-C_8 -, -arileno C_6-C_{14} -, -heteroarileno C_6-C_{14} -, -heteroalquileo C_1-C_8 -, -aralquileo, -heterociclo C_1-C_{10} y -carbociclo C_3-C_8 , donde dichos -alquileo C_1-C_8 -, -arileno C_6-C_{14} -, -heteroarileno C_6-C_{14} -, -heteroalquileo C_1-C_8 -, -aralquileo, -heterociclo C_1-C_{10} y -carbociclo C_3-C_8 están sustituidos con un miembro del grupo seleccionado entre $N(R^E)C(O)$ - donde el carbonilo está unido a L, y $C(O)$ - donde el carbonilo está unido a L, y opcionalmente sustituidos adicionalmente con 1 a 2 R;

donde cada R^E se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H, -alquilo C_1-C_8 -, -heteroalquilo C_1-C_8 -, -arilo, -aralquilo, -heterociclilo C_1-C_{10} -, -carbociclilo C_3-C_8 -, $-C(O)O$ alquilo C_1-C_8 -, $-C(O)N$ (alquilo C_1-C_8)₂ y $-C(O)$ -halo, y en el que cada R^E está opcionalmente sustituido con 1 a 3 sustituyentes seleccionados independientemente entre R;

L es $L^A-L^B-(L^C)_{1-3}$;

L^A se selecciona entre: un enlace a AB, -NR-(enlace a AB), -heteroaril-(enlace a AB),



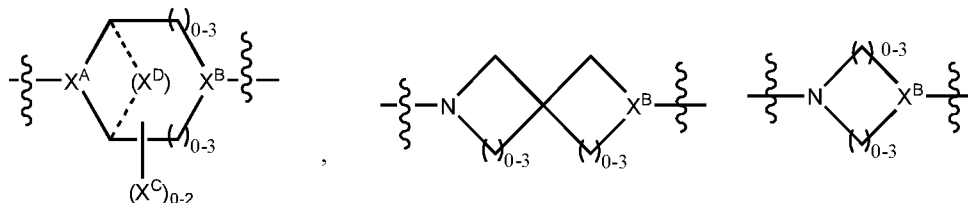
L^B es $L^{B1}-L^{B2}-L^{B3}$

en el que L^{B1} está ausente o es uno o más componentes seleccionados entre el grupo que consiste en $-C(O)$ -, $-C(S)$ -, $-C(O)NR$ -, $-C(O)$ alquil C_1-C_6 -, $-C(O)NR$ alquil C_1-C_6 -, alquil $C_1-C_6(OCH_2CH_2)_{1-6}$ -, $-C(O)$ alquil $C_1-C_6NRC(O)$ -, $-C(O)$ alquil $C_1-C_6(OCH_2CH_2)_{1-6}$ -, alquil $C_1-C_6(OCH_2CH_2)_{1-6}C(O)$ -, alquil C_1-C_6-S-S -alquil $C_1-C_6NRC(O)CH_2$ -, alquil $C_1-C_6(OCH_2CH_2)_{1-6}NRC(O)CH_2$ -, $-C(O)$ alquil $C_1-C_6NRC(O)$ alquil C_{1-6} -, $-N=CR$ -fenil-O-alquil C_1-C_6 -, $-N=CR$ -fenil-O-alquil $C_1-C_6C(O)$ -, $-C(O)$ -alquil $C_1-C_6(OCH_2CH_2)_{1-6}NRC(O)$ -, $-C(O)$ alquil C_1-C_6 -fenil($NRC(O)$ alquil C_1-C_6)₁₋₄-, $-C(O)$ alquil $C_1-C_6(OCH_2CH_2)_{1-6}NRC(O)$ alquil C_1-C_6 -, alquil C_1-C_6 -, $-S$ -, $-C(O)-CH(NRC(O)$ alquil C_1-C_6)-alquil C_1-C_6 - y $-(CH_2-CH_2-O)_{1-20}$;

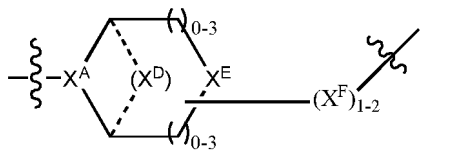
L^{B2} es AA_{0-12} , en el que AA es un aminoácido natural, un aminoácido no natural o $-(CR^{15})_o-S-S-(CR^{15})_p$ donde cada uno de o y p es independientemente un número entero de 1 a 20,

L^{B3} es -PABA-, -PABC-, $-C(O)(CH_2)_nC(O)$ - o está ausente;

L^C está ausente o se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en -alquileo C_1-C_6 -, -NRheterociclil C_3-C_8NR -, -NRcarbociclil C_3-C_8NR -, -NRalquil C_1-C_6NR -, -NRalquileo C_1-C_6 -, $-S$ -, -NR-, -NRNR-, $-O(CR_2)_{1-4}S-S(CR_2)_{1-4}N(R)$ -, -NRalquilenofenileno C_1-C_6NR -, -NRalquilenofenileno $C_1-C_6SO_2NR$ -, -Oalquil C_1-C_6S -Salquil $C_1-C_6C(COOR)NR$ -, -NRC(COOR)alquil C_1-C_6S -Salquil C_1-C_6O -,



y



en el que

X^A es CR o N,

X^B es CH, CR(C(R)₂)₁₋₃NR, CR(C(R)₂)₁₋₃O, CR(C(R)₂)₁₋₃C(O)NR, CR-(C(R)₂)₁₋₃C(O)NRNR, CR(C(R)₂)₁₋₃SO₂NR, CR(C(R)₂)₁₋₃NRNR, CR(C(R)₂)₁₋₃NRC(O) o N;
 cada X^C es R;
 cada X^D es -(CH₂)₁₋₅-, o está ausente;
 X^E es O, S, C(R)₂, C(R)(C(R)₂)₁₋₃-NR₂ o NR, y
 cada X^F es (C(R)₂)₁₋₃-NR o C(R)₂-(C(R)₂)₁₋₃-O.

Aspectos adicionales de la invención incluyen compuestos tales como los mencionados en el presente documento, donde

cada R se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H, deuterio, -alquilo C₁-C₂₀ y -NH₂;

cada V¹ es independientemente O o N(R) para cada sistema de anillo en el que aparece V¹;

cada V² es independientemente O o N(R) para cada sistema de anillo en el que aparece V²;

cada uno de W¹ y W² es independientemente H, -alquilo C₁-C₅, -C(O)OR o -C(O)NR₂ para cada sistema de anillo en el que aparecen W¹ y W²;

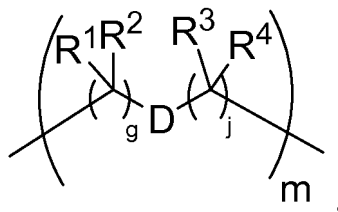
cada X es independientemente halo, para cada sistema de anillo en el que aparece X;

cada Y se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H, -C(O)R^A, -C(O)N(R^A)₂, un carbohidrato tal como glicosilo, -NO₂, -PO(OR^A)₂, un aminoácido y un péptido (en particular un péptido que se escinde con proteasas tales como catepsinas y metaloproteinasas de matriz) para cada sistema de anillo en el que aparece Y, en el que cada R^A se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H, -alquilo C₁-C₂₀, -heteroalquilo C₁-C₈, -carbociclilo C₃-C₈ y -alquil C₁-C₂₀-N(R)₂, en el que dichos alquilo -C₁-C₂₀, -heteroalquilo C₁-C₈, -carbociclilo C₃-C₈ y -alquil C₁-C₂₀-N(R)₂ están opcionalmente sustituidos con 1 a 3 sustituyentes seleccionados independientemente entre R;

cada uno de L¹ y L² se selecciona independientemente entre un enlace directo y carbonilo; y

T se selecciona entre:

-NR^B-T¹-NR^C- donde cada uno de R^B y R^C es independientemente H o -alquilo C₁-C₈, -C(O)hetC(O)- en el que het es un heteroarilo monocíclico de 5 a 12 miembros, que contiene uno o dos heteroátomos seleccionados independientemente entre O, N y S, en el que het está opcionalmente sustituido con 1 a 8 sustituyentes, cada uno seleccionado independientemente entre el grupo que consiste en -alquilo C₁-C₈, -NH₂ y -NH₂, y dichos sustituyentes opcionales en het están opcionalmente sustituidos con -alquilo C₁-C₈, y -C(A¹)X¹-T²-X¹C(B¹)-, donde T² es:



en el que cada X¹ es un enlace, en el que cada uno de A¹ y B¹ es independientemente =O, en el que cada uno de R¹, R², R³ y R⁴ es independientemente H o R¹ y R² forman un sistema de anillo, o R³ y R⁴ forman un sistema de anillo, o ambos R¹ y R², y R³ y R⁴, forman cada uno independientemente sistemas de anillo, o R¹ y R³ forman un sistema de anillo, o R² y R⁴ forman un sistema de anillo, o ambos R¹ y R³, y R² y R⁴, forman cada uno independientemente sistemas de anillo, donde dichos sistemas de anillo se seleccionan independientemente entre -heterociclilo C₁-C₁₀ o -carbociclilo C₃-C₈, y en el que D es un enlace o se selecciona entre el grupo que consiste en -S-, -alquileno C₁-C₈-, -arileno C₆-C₁₄-, -heteroarileno C₆-C₁₄-, -heterociclo C₁-C₁₀ y -carbociclo C₃-C₈, donde dichos -alquileno C₁-C₈-, -arileno C₆-C₁₄-, -heteroarileno C₆-C₁₄-, -heterociclo C₁-C₁₀ y -carbociclo C₃-C₈ están opcionalmente sustituidos con -NH₂, -N(R)C(O)H o -N(R)C(O)OH.

Aspectos adicionales de los compuestos desvelados incluyen compuestos tales como los mencionados en el presente documento donde dos o más R se unen opcionalmente para formar un anillo o anillos.

Aspectos adicionales de los compuestos desvelados incluyen compuestos tales como los mencionados en el presente documento donde

cada R se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H, deuterio, -alquilo C₁-C₂₀ y -NH₂;

cada V¹ es independientemente O o N(R) para cada sistema de anillo en el que aparece V¹;

cada V² es independientemente O o N(R) para cada sistema de anillo en el que aparece V²;

cada uno de W¹ y W² es independientemente H, -alquilo C₁-C₅, -C(O)OR o -C(O)NR₂ para cada sistema de anillo en el que aparecen W¹ y W²;

cada X es independientemente halo, para cada sistema de anillo en el que aparece X;

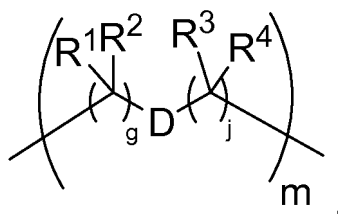
cada Y se selecciona independientemente entre un enlace, H, -C(O)R^A, -C(S)R^A, -C(O)OR^A, -S(O)₂OR^A, -C(O)N(R^A)₂, -C(S)N(R^A)₂, un carbohidrato tal como glicosilo, -NO₂, -P(O)(OR^A)₂, un aminoácido y un péptido (en particular un péptido que se escinde con proteasas tales como catepsinas y metaloproteinasas de matriz) para cada sistema de anillo en el que aparece Y, en el que cada R^A se selecciona independientemente entre H, -alquilo C₁-C₂₀, -heteroalquilo C₁-C₈, -arilo C₆-C₁₄, -alquilo, -heterociclilo C₁-C₁₀, -carbociclilo C₃-C₈, -alquil C₁-C₂₀N(R)₂, -alquileno C₁-C₂₀, -

heteroalquileo C₁-C₈, -arileno C₆-C₁₄, aralquileo, -heterociclo C₁-C₁₀, -carbociclo C₃-C₈ y -alquil C₁-C₂₀N(R)-, y R^F donde dicho R^A está opcionalmente sustituido con 1 a 3 sustituyentes seleccionados independientemente entre R, y en el que un Y es divalente y está unido a L,

R^F es -N(R⁶)QN(R⁵)C(O)- y está unido a L en el carbonilo adyacente N(R⁵), en el que cada uno de R⁵ y R⁶ se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H, -alquilo C₁-C₈ y -heteroalquilo C₁-C₈, o R⁵ o R⁶ se unen con un carbono sustituido en Q para formar un anillo -heterocíclico C₁-C₁₀ o -heteroarilo C₆-C₁₄, o R⁵ y R⁶ se unen para formar un sistema de anillo -heterocíclico C₁-C₁₀ o -heteroarilo C₆-C₁₄, y donde Q es -alquileo C₁-C₈, -arileno C₆-C₁₄ o -carbociclo C₃-C₈, en el que cada uno de Q, R⁵ y R⁶ está opcionalmente sustituido independientemente con 1 a 3 sustituyentes seleccionados independientemente entre R;

cada uno de L¹ y L² se selecciona independientemente entre un enlace directo y carbonilo; y T se selecciona entre:

- NR^B-T¹-NR^C- donde cada uno de R^B y R^C es independientemente H o -alquilo C₁-C₈,
- C(O)hetC(O)- en el que het es un heteroarilo monocíclico de 5 a 12 miembros, que contiene uno o dos heteroátomos seleccionados independientemente entre O, N y S, en el que het está opcionalmente sustituido con 1 a 8 sustituyentes, cada uno seleccionado independientemente entre el grupo que consiste en -alquilo C₁-C₈, -NH₂ y -NH-, y dichos sustituyentes opcionales en het están opcionalmente sustituidos con -alquilo C₁-C₈, y
- C(A¹)X¹-T²-X¹C(B¹)-, donde T² es:



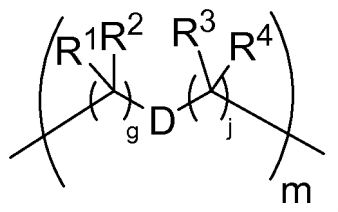
en el que cada X¹ es un enlace, en el que cada uno de A¹ y B¹ es independientemente =O, en el que cada uno de R¹, R², R³ y R⁴ es independientemente H o R¹ y R² forman un sistema de anillo, o R³ y R⁴ forman un sistema de anillo, o ambos R¹ y R², y R³ y R⁴, forman cada uno independientemente sistemas de anillo, o R¹ y R³ forman un sistema de anillo, o R² y R⁴ forman un sistema de anillo, o ambos R¹ y R³, y R² y R⁴, forman cada uno independientemente sistemas de anillo, donde dichos sistemas de anillo se seleccionan independientemente entre -heterociclilo C₁-C₁₀ o -carbociclilo C₃-C₈, y en el que D es un enlace o se selecciona entre el grupo que consiste en -S-, -alquileo C₁-C₈, -arileno C₆-C₁₄, -heteroarileno C₆-C₁₄, -heterociclo C₁-C₁₀ y -carbociclo C₃-C₈, donde dichos -alquileo C₁-C₈, -arileno C₆-C₁₄, -heteroarileno C₆-C₁₄, -heterociclo C₁-C₁₀ y -carbociclo C₃-C₈ están opcionalmente sustituidos con -NH₂, -N(R)C(O)H o -N(R)C(O)OH.

Aspectos adicionales de los compuestos desvelados incluyen compuestos tales como los mencionados en el presente documento donde

cada R se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H, deuterio, -alquilo C₁-C₂₀ y -NH₂; cada V¹ es independientemente O o N(R) para cada sistema de anillo en el que aparece V¹; cada V² es independientemente O o N(R) para cada sistema de anillo en el que aparece V²; cada uno de W¹ y W² es independientemente H, -alquilo C₁-C₅, -C(O)OR o -C(O)NR₂ para cada sistema de anillo en el que aparecen W¹ y W²;

cada X es independientemente halo, para cada sistema de anillo en el que aparece X; cada Y se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H, -C(O)R^A, -C(O)N(R^A)₂, un carbohidrato tal como glicosilo, -NO₂, -PO(OR³)₂, un aminoácido y un péptido (en particular un péptido que se escinde con proteasas tales como catepsinas y metaloproteinasas de matriz) para cada sistema de anillo en el que aparece Y, en el que cada R^A se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H, -alquilo C₁-C₂₀, -heteroalquilo C₁-C₈, -carbociclilo C₃-C₈ y -alquil C₁-C₂₀-N(R)₂, en el que dichos alquilo -C₁-C₂₀, -heteroalquilo C₁-C₈, -carbociclilo C₃-C₈ y -alquil C₁-C₂₀-N(R)₂ están opcionalmente sustituidos con 1 a 3 sustituyentes seleccionados independientemente entre R;

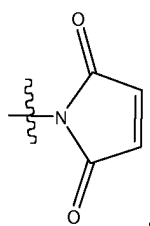
cada uno de L¹ y L² se selecciona independientemente entre un enlace directo y carbonilo; y T es -C(A¹)X¹-T²-X¹C(B¹)-, donde T² es:



en el que cada X¹ es un enlace, en el que cada uno de A¹ y B¹ es independientemente =O, en el que cada uno de R¹,

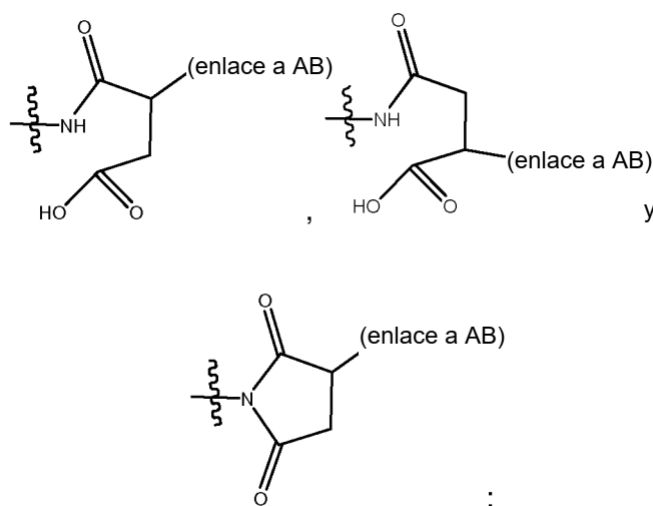
R^2 , R^3 y R^4 es independientemente H o R^1 y R^2 forman un sistema de anillo, o R^3 y R^4 forman un sistema de anillo, o ambos R^1 y R^2 , y R^3 y R^4 , forman cada uno independientemente sistemas de anillo, o R^1 y R^3 forman un sistema de anillo, o R^2 y R^4 forman un sistema de anillo, o ambos R^1 y R^3 , y R^2 y R^4 , forman cada uno independientemente sistemas de anillo, donde dichos sistemas de anillo se seleccionan independientemente entre -heterociclilo C_1-C_{10} o -carbociclilo C_3-C_8 , y en el que D es un enlace o se selecciona entre el grupo que consiste en -S-, -alquilenos C_1-C_8 , -arileno C_6-C_{14} , -heteroarileno C_6-C_{14} , -heterociclo C_1-C_{10} y -carbociclo C_3-C_8 , donde dichos -alquilenos C_1-C_8 , -arileno C_6-C_{14} , -heteroarileno C_6-C_{14} , -heterociclo C_1-C_{10} y -carbociclo C_3-C_8 están opcionalmente sustituidos con -NH₂, -N(R)C(O)H o -N(R)C(O)OH.

Aspectos adicionales de los compuestos desvelados incluyen compuestos tales como los mencionados en el presente documento donde L^A se selecciona entre el grupo que consiste en -halo-, -N(R)₂-, -CON(R)₂-, -S-arilo opcionalmente sustituido con -NO₂ o -CON(R)₂-, -S-heteroarilo opcionalmente sustituido con -NO₂, alquil-SO₂-heteroarilo, arilSO₂-heteroaril-, y



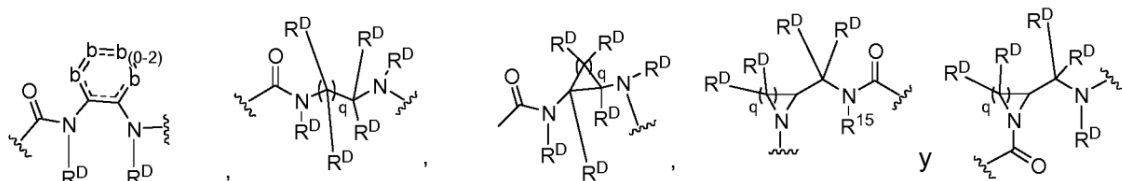
L^B es $L^{B1}-L^{B2}-L^{B3}$ en el que L^{B1} está ausente o es uno o más componentes seleccionados entre el grupo que consiste en -C(O)-, -C(S)-, -C(O)NR-, -C(O)alquil C_1-C_6 -, -C(O)NRalquil C_1-C_6 -, -alquil C_1-C_6 (OCH₂CH₂)₁₋₆-, -C(O)alquil C_1-C_6 NRC(O)-, -C(O)alquil C_1-C_6 (OCH₂CH₂)₁₋₆-, -alquil C_1-C_6 (OCH₂CH₂)₁₋₆-C(O)-, -alquil C_1-C_6 -S-S-alquil C_1-C_6 NRC(O)CH₂-, -alquil C_1-C_6 (OCH₂CH₂)₁₋₆NRC(O)CH₂-, -C(O)alquil C_1-C_6 -NRC(O)alquil C_1-6 -, -C(O)-alquil C_1-C_6 (OCH₂CH₂)₁₋₆NRC(O)-, -C(O)alquil C_1-C_6 -fenil(NR-C(O)alquil C_1-C_6)₁₋₄-, -C(O)alquil C_1-C_6 (OCH₂CH₂)₁₋₆-NRC(O)alquil C_1-C_6 -, -alquil C_1-C_6 -, -S-, -C(O)-CH(NR-C(O)alquil C_1-C_6)-alquil C_1-C_6 - y (-CH₂-CH₂-O)-₁₋₂₀, en el que L^{B2} es AA₀₋₁₂, en el que AA es un aminoácido natural, un aminoácido no natural o -(CR¹⁵)_o-S-S-(CR¹⁵)_p donde cada uno de o y p es independientemente un número entero de 1 a 20, y L^{B3} es -PABA-, -PABC-, -C(O)(CH₂)_nC(O)- o está ausente; y L^C está ausente.

Aspectos adicionales de los compuestos desvelados incluyen conjugados anticuerpo-fármaco tales como los mencionados en el presente documento donde L^A se selecciona entre: un enlace a AB, -NR-(enlace a AB), -heteroaril-(enlace a AB),



L^B es $L^{B1}-L^{B2}-L^{B3}$ en el que L^{B1} está ausente o es uno o más componentes seleccionados entre el grupo que consiste en -C(O)-, -C(S)-, -C(O)NR-, -C(O)alquil C_1-C_6 -, -C(O)NRalquil C_1-C_6 -, -alquil C_1-C_6 (OCH₂CH₂)₁₋₆-, -C(O)alquil C_1-C_6 NRC(O)-, -C(O)alquil C_1-C_6 (OCH₂CH₂)₁₋₆-, -alquil C_1-C_6 (OCH₂CH₂)₁₋₆-C(O)-, -alquil C_1-C_6 -S-S-alquil C_1-C_6 NRC(O)CH₂-, -alquil C_1-C_6 (OCH₂CH₂)₁₋₆NRC(O)CH₂-, -C(O)alquil C_1-C_6 -NRC(O)alquil C_1-6 -, -C(O)-alquil C_1-C_6 (OCH₂CH₂)₁₋₆NRC(O)-, -C(O)alquil C_1-C_6 -fenil(NR-C(O)alquil C_1-C_6)₁₋₄-, -C(O)alquil C_1-C_6 (OCH₂CH₂)₁₋₆-NRC(O)alquil C_1-C_6 -, -alquil C_1-C_6 -, -S-, -C(O)-CH(NR-C(O)alquil C_1-C_6)-alquil C_1-C_6 - y (-CH₂-CH₂-O)-₁₋₂₀, en el que L^{B2} es AA₀₋₁₂, en el que AA es un aminoácido natural, un aminoácido no natural o -(CR¹⁵)_o-S-S-(CR¹⁵)_p donde cada uno de o y p es independientemente un número entero de 1 a 20, y L^{B3} es -PABA-, -PABC-, -C(O)(CH₂)_nC(O)- o está ausente.

Aspectos adicionales de los compuestos desvelados incluyen compuestos tales como los mencionados en el presente documento donde R^F se selecciona entre:



en el que q es 1-10, y cada b es independientemente CR^D , N, NR^D , O o S.

- 5 Aspectos adicionales de los compuestos desvelados incluyen compuestos tales como los mencionados en el presente documento donde uno o más W es alquilo C_1 - C_3 .

Aspectos adicionales de los $\ddagger$ compuestos desvelados incluyen compuestos tales como los mencionados en el presente documento donde X es cloro.

- 10 Aspectos adicionales de los compuestos desvelados incluyen compuestos tales como los mencionados en el presente documento donde un Y es H o $-C(O)$ alquilo C_1 - C_{10} .

Aspectos adicionales de los compuestos desvelados incluyen compuestos tales como los mencionados en el presente documento donde uno o más Z es H.

- 15 Aspectos adicionales de los compuestos desvelados incluyen compuestos tales como los mencionados en el presente documento donde T se selecciona entre una amida o amino-unión-amino de fórmula $-NH-C(O)-NH-$ o $-NH-C(O)-het-C(O)-NH-$.

Aspectos adicionales de los compuestos desvelados incluyen compuestos tales como los mencionados en el presente documento donde la amida es $-C(O)NH-$ o $-NHC(O)-$.

- 20 Aspectos adicionales de los compuestos desvelados incluyen compuestos tales como los mencionados en el presente documento donde het es un heteroarilo seleccionado entre pirrol-2-,5-diil-, fur-2,5-diil-, indol-2,5-diilo, benzofuran-2,5-diilo y 3, 6-dihidrobenczo[1,2-b:4,3-b']dipirrol-2,7-diilo.

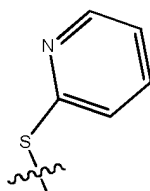
- 25 Aspectos adicionales de los compuestos desvelados incluyen compuestos tales como los mencionados en el presente documento donde L^1 y L^2 se seleccionan entre carbonilo, 2-carbonilindolo-5-ilo, 2-carbonil-6-hidroxi-7-metoxiindol-5-ilo, 2-carbonil-1,2,3,6-tetrahidrobenczo[1,2-b:4,3-b']dipirrol-7-ilo, 2-carbonil-4-hidroxi-5-metoxi-1,2,3,6-tetrahidrobenczo[1,2-b:4,3-b']dipirrol-7-ilo, y 2-carbonil-4-hidroxi-5-metoxi-1,2,3,6-tetrahidrobenczo[1,2-b:4,3-b']dipirrol-7-ilo.

Aspectos adicionales de los compuestos desvelados son aquellos compuestos enumerados en el presente documento donde se aplican uno o más de los siguientes: W es metilo; X es un halógeno; Y es hidrógeno o $-COR$ donde R es alquilo C_1 - C_{10} ; y Z es hidrógeno.

- 30 Los compuestos desvelados también incluyen compuestos como los descritos en el presente documento donde T se selecciona entre una amida (es decir, $-C(O)NH-$ o $-NHC(O)-$); o un amino-unión-amino de fórmula $-NH-T'-NH$ donde T' es carbonilo o $-C(O)-het-C(O)-$. Cuando T es un amino-unión-amino de fórmula $NH-T'-NH$, T' puede ser carbonilo (es decir, $-C(O)-$) o $-C(O)-het-C(O)-$ donde het es un heteroarilo seleccionado entre pirrol-2,5-diil-; fur-2,5-diil-; indol-2,5-diilo; benzofuran-2,5-diilo; o 3, 6-dihidrobenczo[1,2-b:4,3-b']dipirrol-2,7-diilo.

- 35 También se incluyen en realizaciones de los compuestos desvelados aquellos compuestos que se han descrito en el presente documento donde L^1 y L^2 se seleccionan entre 2-carbonilindolo-5-ilo; 2-carbonil-6-hidroxi-7-metoxiindol-5-ilo; 2-carbonil-1,2, 3, 6-tetrahidrobenczo[1,2-b:4,3-b']dipirrol-7-ilo; 2-carbonil-4-hidroxi-5-metoxi-1,2,3,6-tetrahidrobenczo[1,2-b:4,3-b']dipirrol-7-ilo; y 2-carbonil-4-hidroxi-5-metoxi-1,2,3,6-tetrahidrobenczo[1,2-b:4,3-b']dipirrol-7-ilo.

- 40 Otro aspecto de los compuestos desvelados incluye compuestos como los descritos en el presente documento donde L^A es



La invención incluye, también, compuestos enlazador-carga útil o conjugados anticuerpo-fármaco que comprenden un radical de los compuestos carga útil descritos en el presente documento.

- 5 Notablemente, la invención incluye composiciones farmacéuticas de los compuestos, y cualquier sal farmacéuticamente aceptables o solvato de los mismos, descritos en el presente documento, donde la composición farmacéutica incluye un excipiente farmacéuticamente aceptable.

La invención también se refiere a compuestos de la invención, o a una composición o composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más de estos compuestos, para su uso en el tratamiento del cáncer.

- 10 Algunos compuestos, incluyendo cargas útiles, compuestos enlazador-carga útil y ADC representados en el presente documento, se muestran en una forma estereoisomérica específica. La invención, sin embargo, pretende incluir todas las formas estereoisoméricas de estos compuestos. Por ejemplo, un compuesto con dos centros estereoisoméricos puede representarse como la forma R,S del compuesto, pero la invención refleja todas la formas estereoisoméricas, por ejemplo, R,R; R,S; S,R y S,S.

Descripción detallada

- 15 La presente invención se refiere a compuestos bifuncionales citotóxicos, a conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) que comprenden dichos compuestos bifuncionales citotóxicos y a los mismos para su uso para tratar el cáncer y otras afecciones patológicas. También se desvelan procedimientos de uso de dichos compuestos y/o conjugados *in vitro*, *in situ* e *in vivo* para la detección, diagnóstico y tratamiento de células de mamíferos, afecciones patológicas asociadas.

Definiciones y abreviaturas

- 20 A menos que se indique otra cosa, los siguientes términos y frases, tal como se usan en el presente documento, tienen el siguiente significado. Cuando se utilizan marcas comerciales en el presente documento, la marca comercial incluye la formulación del producto, el fármaco genérico y el ingrediente o ingredientes farmacéuticos activos del producto de marca comercial, salvo que se indique otra cosa por el contexto.

- 25 El término "anticuerpo" (o "Ab") en el presente documento se usa en el sentido más amplio y abarca específicamente anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoespecíficos, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpos que presentan la actividad biológica deseada. Un anticuerpo intacto tiene principalmente dos regiones: una región variable y una región constante. La región variable se une e interactúa con un antígeno diana. La región variable incluye una región determinante de complementariedad (CDR) que reconoce y se une a un sitio específico de unión a un antígeno particular. La región constante puede ser reconocida e interactuar con el sistema inmunológico (véase, por ejemplo, Janeway y col., 2001, *Immuno. Biology*, 5ª Ed., Garland Publishing, Nueva York). Un anticuerpo puede ser de cualquier tipo o clase (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD e IgA) o subclase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 y IgA2). El anticuerpo puede provenir de cualquier especie adecuada. En algunas realizaciones, el anticuerpo es de origen humano o murino. Un anticuerpo puede ser, por ejemplo, humano, humanizado o quimérico.

- 35 Las expresiones "se une específicamente" y "unión específica" se refieren a la unión del anticuerpo a un antígeno predeterminado. Por lo general, el anticuerpo se une con una afinidad de al menos aproximadamente $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, y se une al antígeno predeterminado con una afinidad que es al menos dos veces mayor que su afinidad por la unión a un antígeno no específico (por ejemplo, BSA, caseína) que no sea el antígeno predeterminado o un antígeno estrechamente relacionado.

- 40 La expresión "anticuerpo monoclonal" tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto para posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un solo sitio antigénico. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo por ningún procedimiento particular.

- 50 La expresión "anticuerpos monoclonales" incluye específicamente anticuerpos "quiméricos" en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica a u homóloga con la correspondiente secuencia de anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase particular de anticuerpos, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntica a u homóloga con las correspondientes secuencias de anticuerpos derivados de otra

especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de tales anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica y la especificidad deseada.

Un "anticuerpo intacto" es uno que comprende una región variable de unión a antígeno, así como un dominio constante de cadena ligera (C_L) y los dominios constantes de cadena pesada, C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} y C_{H4} , según corresponda para la clase de anticuerpos. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia natural (por ejemplo, dominios constantes de secuencia natural humana) o variantes de secuencia de aminoácidos de los mismos.

Un anticuerpo intacto puede tener una o más "funciones efectoras", que se refiere a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (por ejemplo, una región Fc de secuencia natural o una región Fc de variante de secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpos incluyen citotoxicidad dependiente del complemento, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés) y fagocitosis celular dependiente de anticuerpos.

Un "fragmento de anticuerpo" comprende una porción de un anticuerpo intacto, que preferentemente comprende la unión a antígeno o a la región variable de la misma. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen los fragmentos Fab, Fab', $F(ab')_2$ y Fv, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpos de cadena sencilla, scFv, scFv-Fc, fragmentos de anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos, uno o varios fragmentos producidos por una biblioteca de expresión Fab, o un fragmento de unión al epítipo de cualquiera de los anteriores que se unen inmuno-específicamente a un antígeno diana (por ejemplo, un antígeno de células cancerosas, un antígeno vírico o un antígeno microbiano).

La expresión "variable" en el contexto de un anticuerpo se refiere a ciertas porciones de los dominios variables del anticuerpo que difieren ampliamente en secuencia y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular para su antígeno particular. Esta variabilidad se concentra en tres segmentos llamados "regiones hipervariables" en los dominios variables de la cadena ligera y la cadena pesada. Las partes más altamente conservadas de los dominios variables se denominan regiones marco (FR, por sus siglas en inglés). Los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras naturales comprenden cada uno cuatro FR conectadas por tres regiones hipervariables.

El término "región hipervariable" cuando se usa en el presente documento se refiere a los restos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable generalmente comprende restos de aminoácidos de una "región determinante de complementariedad" o "CDR" (por ejemplo, los restos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (L3) en el dominio variable de cadena pesada; Kabat y col. (Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)) y/o los restos de un "bucle hipervariable" (por ejemplo los restos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Chothia y Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196:901-917). Los restos de FR son aquellos restos de dominio variable distintos de los restos de la región hipervariable tal como se define en el presente documento.

Un fragmento de anticuerpo "Fv de cadena simple" o "scFv" comprende los dominios VH y VL de un anticuerpo, en el que estos dominios están presentes en una sola cadena polipeptídica. Por lo general, el polipéptido de Fv comprende además un enlazador de polipéptido entre los dominios V.sub.H y V.sub.L, lo que permite que scFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión de scFv, véase Pluckthun en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, págs. 269-315 (1994).

El término "diacuerpo" se refiere a fragmentos de anticuerpos pequeños con dos sitios de unión a antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio pesado variable (V_H) conectado a un dominio ligero variable (V_L) en la misma cadena polipeptídica. Usando un enlazador que sea demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena, se fuerza a los dominios a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos se describen más completamente en, por ejemplo, el documento EP 0 404 097; el documento WO 93/11161; y Hollinger y col., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 90:6444-6448.

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, roedores) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de la inmunoglobulina no humana. En su mayoría, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en la que los restos de una región hipervariable del receptor son sustituidos por restos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos de la región marco (FR) de la inmunoglobulina humana están sustituidos por los correspondientes restos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se efectúan para refinar adicionalmente el funcionamiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables se corresponden con los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado comprenderá también opcionalmente al menos una parte de una región constante de la inmunoglobulina (Fc), normalmente de una inmunoglobulina humana. Para más

detalles, véase Jones y col., 1986, Nature 321:522-525; Riechmann y col., 1988, Nature 332:323-329; y Presta, 1992, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596.

tal como se usa en el presente documento, "aislado" significa separado de otros componentes de (a) una fuente natural, tal como una célula vegetal o animal o un cultivo celular, o (b) una mezcla de reacción química orgánica sintética. Tal como se usa en el presente documento, "purificado" significa que cuando está aislado, el aislado contiene al menos el 95 %, y en otro aspecto al menos el 98 %, de un compuesto (por ejemplo, un conjugado) en peso del aislado.

Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado a partir de un componente de su ambiente natural. Los componentes contaminantes de su ambiente natural son materiales que podrían interferir con los usos diagnósticos o terapéuticos del anticuerpo y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En las realizaciones preferidas, el anticuerpo se purificará (1) a más del 95 % en peso de anticuerpo según lo determinado por el procedimiento de Lowry, y lo más preferentemente, a más del 99 % en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de copa giratoria o (3) hasta homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie o, preferentemente, tinción de plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo in situ en el interior de células recombinantes ya que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Habitualmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

Un anticuerpo que "induce apoptosis" es uno que induce la muerte celular programada según lo determinado por la unión de anexina V, fragmentación de ADN, contracción celular, dilatación del retículo endoplásmico, fragmentación celular y/o formación de vesículas de membrana (llamadas cuerpos apoptóticos). La célula es una célula tumoral, por ejemplo, una célula de mama, de ovario, de estómago, de endometrio, de glándula salival, de pulmón, de riñón, de colon, de tiroides, de páncreas o de vejiga. Hay varios procedimientos disponibles para evaluar los eventos celulares asociados con la apoptosis. Por ejemplo, la translocación de fosfatidil serina (PS) se puede medir mediante la unión de anexina; la fragmentación del ADN se puede evaluar a través de marcadores de ADN; y la condensación nuclear/cromatina junto con la fragmentación del ADN pueden evaluarse mediante cualquier aumento en las células hipodiploides.

El término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un fármaco eficaz para tratar una enfermedad o trastorno en un mamífero. En el caso del cáncer, la cantidad terapéuticamente eficaz del medicamento puede reducir la cantidad de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (ralentizar hasta cierto punto y preferentemente detener) la infiltración de células cancerosas en los órganos periféricos; inhibir (ralentizar hasta cierto punto y preferentemente detener) la metástasis tumoral; inhibir, hasta cierto punto, el crecimiento tumoral; y/o aliviar hasta cierto punto uno o más de los síntomas asociados con el cáncer. En la medida en que el medicamento pueda inhibir el crecimiento y/o eliminar las células cancerosas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico. Para el tratamiento del cáncer, la eficacia puede, por ejemplo, medirse evaluando el tiempo hasta la progresión de la enfermedad (TTP, del inglés *time to disease progression*) y/o determinando la tasa de respuesta (RR, del inglés *response rate*).

La expresión "cantidad sustancial" se refiere a una mayoría, es decir, más del 50 % de una población, de una mezcla o una muestra.

La expresión "metabolito intracelular" se refiere a un compuesto que es resultado de un proceso metabólico o reacción dentro de una célula en un conjugado anticuerpo-fármaco (CAF). El proceso o reacción metabólica puede ser un proceso enzimático tal como la escisión proteolítica de un enlazador peptídico del CAF. Los metabolitos intracelulares incluyen, aunque sin limitación, anticuerpos y fármaco libre que se han sometido a escisión intracelular después de la entrada, difusión, captación o transporte a una célula.

Los términos "intracelularmente escindido" y "escisión intracelular" se refieren a un proceso metabólico o reacción dentro de una célula en un CAF o similar, por el cual la unión covalente, por ejemplo, el enlazador, entre el resto del fármaco y el anticuerpo se rompe, dando como resultado el fármaco libre u otro metabolito del conjugado disociado del anticuerpo dentro de la célula. Los restos escindidos del CAF son, por lo tanto, metabolitos intracelulares.

El término "biodisponibilidad" se refiere a la disponibilidad sistémica (es decir, niveles en sangre/plasma) de una cantidad dada de un fármaco administrado a un paciente. La biodisponibilidad es un término absoluto que indica la medición tanto del tiempo (tasa) como de la cantidad total (extensión) del medicamento que alcanza la circulación general desde una forma de dosificación administrada.

La expresión "actividad citotóxica" se refiere a una muerte celular, un efecto citostático o antiproliferativo de un CAF o un metabolito intracelular de dicho CAF. La actividad citotóxica puede expresarse como el valor de CI_{50} , que es la concentración (molar o de masa) por unidad de volumen a la que sobreviven la mitad de las células.

Un "trastorno" es cualquier afección que se beneficiaría del tratamiento con un fármaco o conjugado de anticuerpo-fármaco. Esto incluye trastornos crónicos y agudos o enfermedades que incluyen dichas afecciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Los ejemplos no limitantes de trastornos a tratar en el presente

documento incluyen cánceres benignos y malignos; leucemia y neoplasias linfoides, trastornos neuronales, de la glía, astrocíticos, hipotalámicos y de otras glándulas, macrófagos, epiteliales, estromáticos y blastocélulas; y trastornos inflamatorios, angiogénicos e inmunológicos.

5 Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren a o describen la afección fisiológica o el trastorno en mamíferos que se caracteriza típicamente por un crecimiento celular no regulado. Un "tumor" comprende una o más células cancerosas.

Los ejemplos de un "paciente" incluyen, aunque sin limitación, un ser humano, rata, ratón, cobaya, mono, cerdo, cabra, vaca, caballo, perro, gato, pájaros y aves. En una realización ejemplar, el paciente es un ser humano.

10 Los términos "tratar" o "tratamiento", salvo que se indique otra cosa por el contexto, se refieren al tratamiento terapéutico y medidas profilácticas para evitar la recaída, en el que el objeto es inhibir o ralentizar (disminuir) un cambio o trastorno fisiológico no deseado, como el desarrollo o la propagación del cáncer. Para los fines de la presente invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, aunque sin limitación, el alivio de síntomas, la disminución del grado de la enfermedad, el estado patológico estabilizado (es decir, sin empeoramiento), el retraso o la ralentización de la progresión de la enfermedad, la mejora o la atenuación del estado patológico y la remisión (bien total o parcial), ya sea detectable o indetectable. "Tratamiento" también significa prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no recibiera tratamiento. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya tienen la afección o trastorno, así como aquellos propensos a tener la afección o trastorno.

15 En el contexto del cáncer, el término "tratar" incluye cualquiera o todos los inhibidores del crecimiento de células tumorales, células cancerosas o de un tumor; la inhibición de la replicación de células tumorales o células cancerosas, la disminución de la carga tumoral general o la disminución del número de células cancerosas, y la mejora de uno o más síntomas asociados con la enfermedad.

20 En el contexto de una enfermedad autoinmunitaria, el término "tratar" incluye cualquiera o todos de la inhibición de la replicación de células asociadas con un estado patológico autoinmune que incluye, aunque no de forma limitativa, células que producen un anticuerpo autoinmune, la disminución de la carga de anticuerpos autoinmunes y la mejora de uno o más síntomas de una enfermedad autoinmune.

25 En el contexto de una enfermedad infecciosa, el término "tratar" incluye cualquiera o todos de: la inhibición del crecimiento, la multiplicación o la replicación del patógeno que causa la enfermedad infecciosa y la mejora de uno o más síntomas de una enfermedad infecciosa.

30 El término "prospecto" se utiliza para referirse a las instrucciones habitualmente incluidas en los paquetes comerciales de productos terapéuticos, que contienen información sobre las indicaciones, el uso, la dosificación, la administración, las contraindicaciones y/o las advertencias sobre el uso de dichos productos terapéuticos.

35 Tal como se usa en el presente documento, los términos "célula", "línea celular", y "cultivo celular" se usan indistintamente y todas esas designaciones incluyen la progenie. Las palabras "transformantes" y "células transformadas" incluyen la célula principal y los cultivos o la progenie que proviene de la misma sin tener en cuenta el número de transferencias. También se entiende que toda la progenie puede no ser exactamente idéntica en contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o inadvertidas. Se incluye la progenie mutante que tiene la misma función o actividad biológica que la seleccionada en la célula transformada originalmente. Cuando se pretenda hacer designaciones distintas, será claro por el contexto.

40 Tal como se usa en el presente documento, CBI se refiere a 1,2,9,9a-tetrahidro-4H-benzo[e]ciclopropa[c]indol-4-ona, o una forma sustituida o derivada de la misma. CBI también puede referirse a la forma seco de CBI, o seco-CBI, que también se conoce como 1-(clorometil)-2,3-dihidro-1H-benzo[e]indol-5-ol, o una forma (o formas) sustituida o derivatizada de las mismas.

45 Tal como se usa en el presente documento, CPI se refiere a 1,2,8,8a-tetrahidrociclopropa[c]pirrolo[3,2-e]indol-4(5H)-ona o una forma sustituida o derivatizada de la misma. CPI también puede referirse a la forma seco de CPI, o seco-CPI, que también se conoce como 8-(clorometil)-1-metil-3,6,7,8-tetrahidropirrolo[3,2-e]indol-4-ol, o una forma (o formas) sustituidas o derivadas de las mismas.

50 A menos que se indique lo contrario, el término "alquilo", por sí mismo o como parte de otro término, se refiere a un hidrocarburo saturado, de cadena lineal o ramificada, que tiene el número indicado de átomos de carbono (por ejemplo, alquilo "C₁-C₈" se refiere a un grupo alquilo que tiene de 1 a 8 átomos de carbono). Típicamente, los grupos alquilo contienen de 1 a 20 átomos de carbono, preferentemente de 1 a 8 átomos de carbono, y más preferentemente de 1 a 4 átomos de carbono. Cuando no se indica el número de átomos de carbono, el grupo alquilo tiene de 1 a 8 átomos de carbono. Los alquilos C₁-C₈ de cadena lineal representativos incluyen, pero sin limitación, metilo, etilo, n-propilo, n-butilo, n-pentilo, n-hexilo, n-heptilo y n-octilo; mientras que los alquilos C₁-C₈ ramificados incluyen, pero sin limitación, -isopropilo, -sec-butilo, -isobutilo, -terc-butilo, -isopentilo y -2-metilbutilo; los alquilos C₂-C₈ insaturados incluyen, pero sin limitación, vinilo, alilo, 1-butenilo, 2-butenilo, isobutilenilo, 1-pentenilo, 2-pentenilo, 3-metil-1-butenilo, 2-metil-2-butenilo, 2,3-dimetil-2-butenilo, 1-hexilo, 2-hexilo, 3-hexilo, acetilenilo, propinilo, 1-butinilo, 2-butinilo, 1-pentinilo, 2-

pentinilo y 3-metil-1-butinilo. La referencia a "alquilo" en el presente documento se refiere a restos sin sustituir y sustituidos, como se han descrito anteriormente.

A menos que se indique otra cosa, "alquileno", por sí mismo o como parte de otro término, se refiere a un radical de hidrocarburo saturado de cadena lineal o ramificada o cíclico del número indicado de átomos de carbono, típicamente 1-18 átomos de carbono, y que tiene dos centros de radicales monovalentes derivados mediante la eliminación de dos átomos de hidrógeno de los mismos o dos átomos de carbono diferentes de un alcano original.) Los grupos alquileno comprenden típicamente de 1 a 18 átomos de carbono, preferentemente de 1 a 10 átomos de carbono, más preferentemente de 1 a 8 átomos de carbono, y lo más preferentemente de 1 a 4 átomos de carbono. Los radicales alquileno típicos incluyen, pero sin limitación: metileno ($-\text{CH}_2-$), 1,2-etileno ($-\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 1,3-propileno ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 1,4-butileno ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$) y similares. Un alquileno "C₁-C₁₀" de cadena lineal es un grupo hidrocarburo saturado, de cadena lineal, de fórmula $-(\text{CH}_2)_{1-10}-$. Los ejemplos de un alquileno C₁-C₁₀ incluyen metileno, etileno, propileno, butileno, pentileno, hexileno, heptileno, octileno, nonileno y decaleno. En el presente documento, cualquier mención a "alquileno" se refiere a restos sin sustituir y sustituidos como se han descrito anteriormente.

A menos que se indique otra cosa, el término "heteroalquilo", por sí mismo o junto con otro término, significa, a menos que se indique otra cosa, un hidrocarburo estable de cadena lineal o ramificada, o sus combinaciones, totalmente saturado o que contiene de 1 a 3 grados de insaturación, que consiste en el número indicado de átomos de carbono y de uno a tres heteroátomos seleccionados entre el grupo que consiste en O, N, Si y S, y en el que los átomos de nitrógeno y azufre pueden estar opcionalmente oxidados y el heteroátomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado. El heteroátomo o heteroátomos O, N y S pueden estar situados en cualquier posición interior del grupo heteroalquilo. El heteroátomo Si puede estar situado en cualquier posición del grupo heteroalquilo, incluyendo la posición en la que el grupo alquilo está unido al resto de la molécula. Hasta dos heteroátomos pueden ser consecutivos. Los grupos heteroalquilo comprenden típicamente de 1 a 15 átomos de carbono, preferentemente de 1 a 12 átomos de carbono, más preferentemente de 1 a 8 átomos de carbono, y lo más preferentemente de 1 a 4 átomos de carbono. Cualquier mención a "heteroalquilo" en el presente documento se refiere a restos sin sustituir y sustituidos como se ha descrito anteriormente.

A menos que se indique otra cosa, el término "heteroalquileno", por sí mismo o como parte de otro sustituyente, significa un grupo divalente obtenido a partir de heteroalquilo (como se ha tratado anteriormente). Para los grupos heteroalquileno, los heteroátomos también pueden ocupar cualquiera o ambos extremos de la cadena. Cualquier mención a "heteroalquileno" en el presente documento se refiere a restos sin sustituir y sustituidos como se ha descrito anteriormente.

Típicamente, el término H o hidrógeno en el presente documento se refiere a un átomo de hidrógeno que comprende un solo protón y ningún neutrón, pero también incluye el isótopo de hidrógeno conocido como deuterio que comprende un solo protón y un solo neutrón.

A menos que se indique otra cosa, "arilo", por sí mismo o una parte de otro término, significa un radical de hidrocarburo aromático, carbocíclico, monovalente, sustituido o sin sustituir, de 5-20, preferentemente 5-14 o 6-14, átomos de carbono, obtenido a partir de la eliminación de un átomo de hidrógeno de un solo átomo de carbono de un sistema de anillo aromático parental. Los grupos arilo típicos incluyen, pero sin limitación, radicales derivados de benceno, benceno sustituido, naftaleno, antraceno, bifenilo y similares. Un grupo aromático carbocíclico sustituido (por ejemplo, un grupo arilo) puede estar sustituido con uno o más, preferentemente de 1 a 5, de los siguientes grupos: alquilo C₁-C₈, -O(alquilo C₁-C₈), -C(O)R⁹, -OC(O)R⁹, -C(O)OR⁹, -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, halógeno, -N₃, -NH₂, -NH(R⁹), -N(R⁹)₂ y -CN; en los que cada R⁹ se selecciona independientemente entre -H, alquilo C₁-C₈ y arilo sin sustituir. En algunas realizaciones, un grupo aromático carbocíclico sustituido puede incluir adicionalmente uno o más de: -NHC(=NH)NH₂, -NHCONH₂, -S(=O)₂R⁹ y -SR⁹. "Arleno" es el resto divalente correspondiente.

"Alquilo sustituido" (o "alquileno sustituido", "heteroalquilo sustituido" o "heteroalquileno sustituido") significa un grupo o radical que contiene alquilo adecuado como se ha analizado anteriormente en el que uno o más átomos de hidrógeno se reemplazan, cada uno independientemente, por un sustituyente. Los sustituyentes típicos incluyen, pero sin limitación, -X, -R¹⁰, -O-, -OR¹⁰, -SR¹⁰, -S-, -NR¹⁰, -NR¹⁰₂, =NR¹⁰, -CX₃, -CN, -OCN, -SCN, -N=C=O, -NCS, -NO, -NO₂, =N₂, -N₃, -N R¹⁰C(=O)R¹⁰R¹⁰, -C(=O)NR¹⁰₂, -SO₃⁻, -SO₃H, -S(=O)₂R¹⁰, -OS(=O)₂OR¹⁰, -S(=O)₂NR¹⁰, -S(=O)R¹⁰, -OP(=O)(OR¹⁰)₂, -P(=O)(OR¹⁰)₂, -PO₃²⁻, PO₃H₂, -AsO₂H₂, -C(=O)R¹⁰, -C(=O)X, -C(=S)R¹⁰, -CO₂R¹⁰, -CO₂⁻, -C(=S)OR¹⁰, -C(=O)SR¹⁰, -C(=S)SR¹⁰, -C(=O)NR¹⁰₂, -C(=S)NR¹⁰₂ o -C(=N R¹⁰)N R¹⁰₂, en los que cada X es independientemente un halógeno: -F, -Cl, -Br o -I; y cada R¹⁰ es independientemente -H, alquilo C₁-C₂₀, heteroalquilo C₁-C₂₀, arilo C₆-C₂₀, heterociclilo C₁-C₁₀, un grupo protector o un resto de profármaco. Los grupos arilo, alquileno y heteroalquileno como se ha descrito anteriormente también pueden estar sustituidos de manera similar.

A menos que se indique otra cosa, "aralquilo", por sí mismo o como parte de otro término, significa un grupo alquilo, como se ha definido anteriormente, sustituido con un grupo arilo, como se ha definido anteriormente.

A menos que se indique otra cosa, "heterociclilo C₃-C₁₀", por sí mismo o como parte de otro término, se refiere a un sistema de anillo monocíclico, bicíclico o tricíclico, aromático o no aromático, sustituido o sin sustituir, monovalente, que tiene de 2 a 10, de 2 a 14 o 2-20 átomos de carbono, preferentemente de 3 a 8, átomos de carbono (también

denominados miembros de anillo) y de uno a cuatro miembros de anillo heteroátomos seleccionados independientemente entre N, O, P o S, y derivados por la eliminación de un átomo de hidrógeno de un átomo del anillo de un sistema de anillo parental. Uno o más de los átomos de N, C o S en el heterociclilo se pueden oxidar. El anillo que incluye el heteroátomo puede ser aromático o no aromático. En el presente documento, los heterociclos aromáticos se denominan, en algunas ocasiones, heteroarilos. A menos que se indique otra cosa, el heterociclilo está unido a su grupo colgante en cualquier heteroátomo o átomo de carbono que dé como resultado una estructura estable. Los ejemplos representativos de un heterociclilo C₂-C₁₀ incluyen, pero sin limitación, tetrahidrofuranilo, oxetanilo, piranilo, pirrolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, benzofuranilo, benzotiofeno, benzotiazolilo, indolilo, benzopirazolilo, pirrolilo, tiofenilo (tiofeno), furanilo, tiazolilo, imidazolilo, pirazolilo, triazolilo, quinolinilo, incluyendo restos tales como 1,2,3,4-tetrahidro-quinolinilo, pirimidinilo, piridinilo, piridonilo, pirazinilo, piridazinilo, isotiazolilo, isoxazolilo, tetrazolilo, epóxido, oxetano y BODIPY (sustituido o sin sustituir). Un heterociclilo C₂-C₁₀ puede estar sustituido hasta con siete grupos incluyendo, pero sin limitación, alquilo C₁-C₈, heteroalquilo C₁-C₈, -OR¹¹, arilo, -C(O)R¹¹, -OC(O)R¹¹, -C(O)OR¹¹, -C(O)NH₂, -C(O)NHR¹¹, -C(O)N(R¹¹)₂, -NHC(O)R¹¹, -S(=O)₂R¹¹, -S(O)R¹¹, halógeno, -N₃, -NH₂, -NH(R¹¹), -N(R¹¹)₂ y -CN; en los que cada R¹¹ se selecciona independientemente entre -H, alquilo C₁-C₈, heteroalquilo C₁-C₈ y arilo. En algunas realizaciones, un heterociclilo sustituido también puede incluir uno o más de: -NHC(=NH)NH₂, -NHCONH₂, -S(=O)₂R¹¹ y -SR¹¹. Heterociclo o heterociclo C₂-C₁₀ es el resto divalente correspondiente. En el presente documento, los heterociclos aromáticos divalentes se denominan, en algunas ocasiones, heteroarileno o heteroarileno C₂-C₁₀.

Como se ha indicado anteriormente, En el presente documento, los heterociclos aromáticos se denominan, en algunas ocasiones, heteroarilos, y preferentemente contienen 5-14, 6-14, o 6-20 átomos de carbono además de heteroátomos. Los heteroarilos pueden ser sistemas de anillo monocíclicos, bicíclicos o tricíclicos. Los heteroarilos representativos incluyen, pero sin limitación, triazolilo, tetrazolilo, oxadiazolilo, piridilo, furilo, benzofuranilo, tiofenilo, benzotiofenilo, quinolinilo, pirrolilo, indolilo, oxazolilo, benzoxazolilo, imidazolilo, benzoimidazolilo, tiazolilo, benzotiazolilo, isoxazolilo, pirazolilo, isotiazolilo, piridazinilo, pirimidinilo, pirazinilo, triazinilo, cinnolinilo, ftalazinilo, quinazolinilo, pirimidilo, azepinilo, oxepinilo y quinoxalinilo. Los heteroarilos están opcionalmente sustituidos. Los sustituyentes típicos incluyen, pero sin limitación, -X, -R^h, -O-, -OR^h, -SR^h, -S-, -NR^h, -NR^h₂, -NR^h₃, =NR^h, -CX₃, -CN, -OCN, -SCN, -N=C=O, -NCS, -NO, -NO₂, =N₂, -N₃, -NR^hC(=O)R^h, -C(=O)NR^h₂, -SO₃⁻, -SO₃H, -S(=O)₂R^h, -OS(=O)₂OR^h, -S(=O)₂NR^h, -S(=O)R^h, -OP(=O)(OR^h)₂, -P(=O)(OR^h)₂, -PO₃²⁻, PO₃H₂, -AsO₂H₂, -C(=O)R^h, -C(=O)X, -C(=S)R^h, -CO₂R^h, -CO₂⁻, -C(=S)OR^h, -C(=O)SR^h, -C(=S)SR^h, -C(=O)NR^h₂, -C(=S)NR^h₂, -C(=NR)NR^h₂, heteroalquilo C₁-C₂₀, arilo C₆-C₂₀, heterociclilo C₃-C₈, un grupo protector o un resto de profármaco, en los que cada X es independientemente un halógeno: -F, -Cl, -Br o -I; y cada R^h es independientemente -H o alquilo C₁-C₈. En el presente documento, los heterociclos aromáticos divalentes se denominan, en algunas ocasiones, heteroarilenos o heteroarilenos C₁-C₁₀.

A menos que se indique otra cosa, "heteroaralquilo", por sí mismo o como parte de otro término, significa un grupo alquilo, como se ha definido anteriormente, sustituido con un grupo heterociclilo aromático, como se ha definido anteriormente. Heteroaralquilo es el resto divalente correspondiente.

A menos que se indique otra cosa, "carbociclilo C₃-C₈", por sí mismo o como parte de otro término, es un anillo carbocíclico, monocíclico o bicíclico, no aromático, saturado o insaturado, sustituido o sin sustituir, monovalente, de 3, 4, 5, 6, 7 u 8 miembros, derivado mediante la eliminación de un átomo de hidrógeno de un átomo del anillo de un sistema de anillo parental. Los grupos carbociclilo C₃-C₈ representativos incluyen, pero sin limitación, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclopentadienilo, ciclohexilo, ciclohexenilo, 1,3-ciclohexadienilo, 1,4-ciclohexadienilo, cicloheptilo, 1,3-cicloheptadienilo, 1,3,5-cicloheptatrienilo, ciclooctilo, ciclooctadienilo, biciclo(1.1.1.)pentano y biciclo(2.2.2.)octano. Un grupo carbociclilo C₃-C₈ puede estar sin sustituir o sustituido hasta con siete grupos, incluyendo, pero sin limitación, alquilo C₁-C₈, heteroalquilo C₁-C₈, -OR¹¹, arilo, -C(O)R¹¹, -OC(O)R¹¹, -C(O)OR¹¹, -C(O)NH₂, -C(O)NHR¹¹, -C(O)N(R¹¹)₂, -NHC(O)R¹¹, -S(=O)₂R¹¹, -S(=O)R¹¹, -OH, -halógeno, -N₃, -NH₂, -NH(R¹¹), -N(R¹¹)₂ y -CN; donde cada R¹¹ se selecciona independientemente entre -H, alquilo C₁-C₈, heteroalquilo C₁-C₈ y arilo. "carbociclo C₃-C₈" es el resto divalente correspondiente.

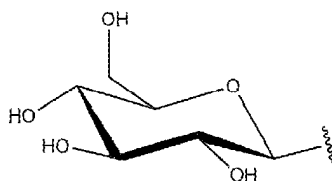
Como se usa en el presente documento, un sustituyente azido se refiere a -N=N=N; un sustituyente cianato se refiere a -O-CN; un sustituyente tiocianato se refiere a -S-CN; un sustituyente isocianato se refiere a -N=C=O; y un sustituyente tioisocianato se refiere a -S-N=C=O.

El término "quiral" se refiere a moléculas que tienen la propiedad de no superposición del compañero de imagen especular, mientras que el término "aquiral" se refiere a moléculas que pueden superponerse sobre su compañero de imagen especular.

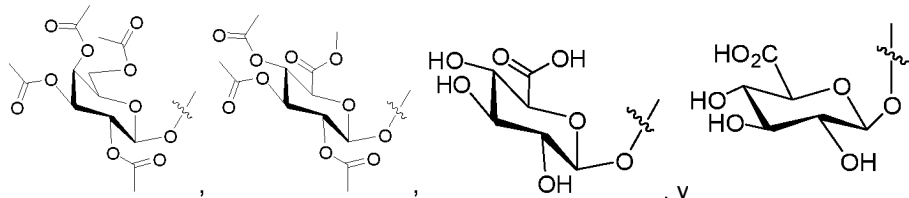
El término "estereoisómeros" se refiere a compuestos que tienen idéntica constitución química, pero se diferencian con respecto a la disposición de los átomos o grupos en el espacio.

"Diastereómero" se refiere a un estereoisómero con dos o más centros de quiralidad y cuyas moléculas no son imágenes especulares entre sí. Los diastereómeros tienen propiedades físicas diferentes, por ejemplo, puntos de fusión, puntos de ebullición, propiedades espectrales y reactividades. Las mezclas de diastereómeros pueden separarse en procedimientos analíticos de alta resolución tales como electroforesis y cromatografía.

"Glicosilo" se refiere a la estructura:



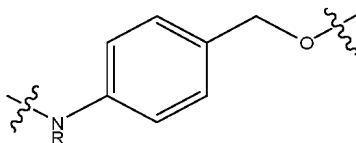
o formas sustituidas de la misma, por ejemplo, las que incluyen las estructuras de referencia sustituidas para formar estructuras tales como:



5 y muchas otras.

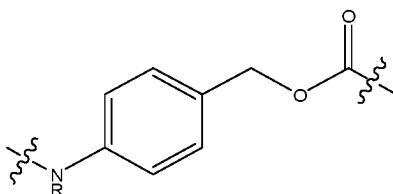
Las definiciones y convenciones estereoquímicas usadas en el presente documento generalmente siguen S. P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms, McGraw-Hill Book Company, Nueva York (1984); y Eliel and Wilen, Stereochemistry of Organic Compounds, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York (1994). Muchos compuestos orgánicos existen en formas ópticamente activas, es decir, tienen la capacidad de rotar el plano de luz polarizada en el plano. A la hora de describir un compuesto ópticamente activo, los prefijos D y L o R y S se usan para indicar la configuración absoluta de la molécula alrededor de su centro o centros quirales. Los prefijos d y l o (+) y (-) se emplean para designar el signo de rotación del plano de luz polarizada por el compuesto, de forma que (-) o l significa que el compuesto es levógiro. Un compuesto con el prefijo (+) o d es dextrógiro. Para una estructura química dada, estos estereoisómeros son idénticos, con la excepción de que son imágenes especulares entre sí. Un estereoisómero específico también puede denominarse un enantiómero, y una mezcla de dichos isómeros normalmente se denomina mezcla enantiomérica. Una mezcla 50:50 de enantiómeros se denomina mezcla racémica o racemato, que puede aparecer cuando no ha habido estereoselección o estereoespecificidad en una reacción o procedimiento químico. Los términos "mezcla racémica" y "racemato" se refieren a una mezcla equimolar de dos especies enantioméricas, desprovista de actividad óptica.

20 Como se usa en el presente documento, "-PABA-" o "PABA" se refiere al ácido p-aminobenzoico y restos derivados del mismo, por ejemplo, la estructura:



o variantes de la misma.

25 Como se usa en el presente documento, "-PABC-" o "PABC" se refiere a p-aminobenciloxicarbonilo y restos derivados del mismo, por ejemplo, la estructura:



o variantes de la misma.

30 Un "derivado" aminoácido incluye un aminoácido que tiene sustituciones o modificaciones por unión covalente de un aminoácido parental, tal como, por ejemplo, por alquilación, glicosilación, acetilación, fosforilación y similares. También se incluyen dentro de la definición de "derivado", por ejemplo, uno o más análogos de aminoácido con engarces sustituidos, así como otras modificaciones conocidas en la técnica.

Un "aminoácido natural" se refiere a arginina, glutamina, fenilalanina, tirosina, triptófano, lisina, glicina, alanina, histidina, serina, prolina, ácido glutámico, ácido aspártico, treonina, cisteína, metionina, leucina, asparagina, isoleucina y valina, a menos que se indique otra cosa por el contexto.

"Grupo protector" se refiere a un resto que, cuando se une a un grupo reactivo en una molécula, enmascara, reduce o previene esa reactividad. Pueden encontrarse ejemplos de grupos protectores en T. W. Greene y P. G. M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3ª edición, John Wiley & Sons, Nueva York, 1999, y Harrison and Harrison y col., *Compendium of Synthetic Organic Methods*, vol. 1-8 (John Wiley y Sons, 1971-1996). Los grupos protectores de hidroxilo representativos incluyen grupos acilo, bencilo y éteres de tritilo, éteres de tetrahidropirano, éteres de trialkilsililo y éteres de alilo. Los grupos protectores de amino representativos incluyen, formilo, acetilo, trifluoroacetilo, bencilo, benciloxycarbonilo (CBZ), *tert*-butoxycarbonilo (Boc), trimetilsililo (TMS), 2-trimetilsilil-etanosulfonilo (SES), grupos tritilo y tritilo sustituidos, aliloxycarbonilo, 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc), nitro-veratriloxycarbonilo (NVOC) y similares.

Los ejemplos de un "grupo protector de hidroxilo" incluyen, pero sin limitación, metoximetil éter, 2-metoxietoximetil éter, tetrahidropirano éter, bencil éter, *p*-metoxibencil éter, trimetilsilil éter, trietilsilil éter, triisopropil silil éter, *t*-butildimetil silil éter, trifenilmetil silil éter, éster de acetato, ésteres de acetato sustituidos, pivalato, benzoato, metanosulfonato y *p*-toluenosulfonato.

"Grupo saliente" se refiere a un grupo funcional que puede estar sustituido con otro grupo funcional. Dichos grupos salientes son bien conocidos en la técnica, y sus ejemplos incluyen, pero sin limitación, un haluro (por ejemplo, cloruro, bromuro, yoduro), metanosulfonilo (mesilo), *p*-toluenosulfonilo (tosilo), trifluorometilsulfonilo (triflato) y trifluorometilsulfonato.

La expresión "sal farmacéuticamente aceptable", como se usa en el presente documento, se refiere a sales orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente aceptables de un compuesto. El compuesto típicamente contiene al menos un grupo amino y, por consiguiente, pueden formarse sales de adición de ácidos con este grupo amino. Las sales ejemplares incluyen, pero sin limitación, sales sulfato, citrato, acetato, oxalato, cloruro, bromuro, yoduro, nitrato, bisulfato, fosfato, fosfato ácido, isonicotinato, lactato, salicilato, citrato ácido, tartrato, oleato, tanato, pantotenato, bitartrato, ascorbato, succinato, maleato, malato, gentisinato, fumarato, gluconato, glucuronato, sacarato, formiato, benzoato, glutamato, metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato, *p*-toluenosulfonato y pamoato (es decir, 1,1'-metileno-bis-(2-hidroxí-3-naftoato)). Una sal farmacéuticamente aceptable puede implicar la inclusión de otra molécula, tal como un ion acetato, un ion succinato u otro contraión. El contraión puede ser cualquier resto orgánico o inorgánico que establezca la carga en el compuesto parental. Además, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener más de un átomo cargado en su estructura. Los casos en los que múltiples átomos cargados son parte de la sal farmacéuticamente aceptable pueden tener múltiples contraiones. Por lo tanto, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener uno o más átomos cargados y/o uno o más contraiones.

"Solvato farmacéuticamente aceptable" o "solvato" se refieren a una asociación de una o más moléculas de disolvente y un compuesto o conjugado de la invención. Los ejemplos de disolventes que forman solvatos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación, agua, isopropanol, etanol, metanol, DMSO, acetato de etilo, ácido acético y etanolamina.

Los términos "carga" o "carga de fármaco" o "carga útil" representan o se refieren al número promedio de cargas útiles ("carga útil" y "cargas útiles" se usan de forma intercambiable en el presente documento con "fármaco" y "fármacos") por anticuerpo en una molécula de CAF. La carga de fármaco puede variar de 1 a 20 fármacos por anticuerpo. Esto a veces se cita como el DAR, o la proporción de fármaco frente a anticuerpo (por sus siglas en inglés). Las composiciones de los CAF descritos en el presente documento típicamente tienen DAR de 1-20, y en ciertas realizaciones de 1-8, de 2-8, de 2-6, de 2-5 y de 2-4. Los valores típicos de DAR son 2, 4, 6 y 8. El número promedio de fármacos por anticuerpo, o valor DAR, puede caracterizarse por medios convencionales tales como la espectroscopía UV/visible, espectrometría de masas, ensayo ELISA y HPLC. El valor DAR cuantitativo también se puede determinar. En algunos casos, la separación, la purificación y la caracterización de CAF homogéneos que tienen un valor DAR particular se puede lograr por medios tales como HPLC de fase inversa o electroforesis. El DAR puede estar limitado por el número de sitios de unión en el anticuerpo. Por ejemplo, cuando la unión es un tiol de cisteína, un anticuerpo puede tener solo uno o varios grupos tiol de cisteína, o puede tener solo uno o varios grupos tiol suficientemente reactivos a través de los cuales se puede unir una unidad enlazadora. En algunas realizaciones, el tiol de cisteína es un grupo tiol de un resto de cisteína que forma un enlace disulfuro intercatenario. En algunas realizaciones, el tiol de cisteína es un grupo tiol de un resto de cisteína que no forma un enlace disulfuro intercatenario. Por lo general, menos que el máximo teórico de restos de fármaco se conjugan con un anticuerpo durante una reacción de conjugación. Un anticuerpo puede contener, por ejemplo, muchos restos de lisina que no reaccionan con un enlazador o un intermediario de enlazador. Solo los grupos de lisina más reactivos pueden reaccionar con un reactivo enlazador que es reactivo.

Generalmente, los anticuerpos no contienen muchos, en caso de haberlos, grupos tiol de cisteína libres y reactivos que pueden estar unidos a un fármaco a través de un enlazador. La mayoría de los restos de tiol de cisteína en los anticuerpos existen como puentes disulfuro y deben reducirse con un agente reductor tal como el ditioneol (DTT). El anticuerpo puede someterse a condiciones desnaturalizantes para revelar grupos nucleofílicos reactivos tales como lisina o cisteína. La carga (proporción fármaco/anticuerpo) de un CAF puede controlarse de varias maneras diferentes, que incluyen: (i) limitar el exceso molar de fármaco-enlazador en relación con el anticuerpo, (ii) limitar el tiempo o temperatura de reacción de conjugación, y (iii) condiciones reductoras parciales o limitantes para la modificación del tiol de cisteína. Cuando más de un grupo nucleófilo reacciona con un fármaco-enlazador, el producto resultante es

una mezcla de CAF con una distribución de uno o más restos de fármacos por anticuerpo. El número promedio de fármacos por anticuerpo puede calcularse a partir de la mezcla mediante, por ejemplo, doble ensayo de anticuerpos ELISA, específico para anticuerpo y específico para el fármaco. Los CAF individuales pueden identificarse en la mezcla por espectroscopía de masas y separarse por HPLC, por ejemplo, cromatografía de interacción hidrofóbica.

- 5 A continuación se muestra una lista de abreviaturas y definiciones que de otra manera no se podrían definir o describir en la presente solicitud: DMSO (se refiere a dimetilsulfóxido), HRMS (se refiere a espectrometría de masas de alta resolución), DAD (se refiere a la detección de matriz de diodos), TFA (se refiere al ácido 2,2,2-trifluoroacético o ácido trifluoroacético), TFF (se refiere a filtración por flujo tangencial), EtOH (se refiere a etanol), PM (se refiere al peso molecular), HPLC (se refiere a la cromatografía líquida de alto rendimiento), HPLC de preparación (se refiere a cromatografía líquida preparativa de alto rendimiento), etc. (se refiere a y así sucesivamente), tritilo (se refiere a 1,1',1"-etano-1,1,1-triiltribenceno), THF (se refiere a tetrahidrofurano), NHS (se refiere a 1-hidroxi-2,5-pirrolidinediona), Cbz (se refiere a carboxibencilo), eq. (se refiere al equivalente), n-BuLi (se refiere a n-butil litio), OAc (se refiere a acetato), MeOH (se refiere a metanol), *i-Pr* (se refiere a isopropilo o propan-2-ilo), NMM (se refiere a 4-metilmorfolina) y "-" (en una tabla se refiere a que no hay datos disponibles en este momento).
- 15 Los restos y sustituyentes divalentes usados en el presente documento pretenden referirse a dichos restos o sustituyentes unidos o enlazados en cualquier dirección o en ambas direcciones. Por ejemplo, el resto -C(O)NR- (en la definición de L^{B1}, y en otros lugares) está destinado a transmitir -C(O)NR- así como -NRC(O)-, el resto -C(O)-alquilo C₁-C₆- está destinado a transmitir -C(O)C-alquilo C₁-C₆, así como -alquil-C₁-C₆-C(O)-, y así sucesivamente. Más generalmente, una descripción de un resto divalente no simétrico enlazado en sus lados "izquierdo" y "derecho"
- 20 pretende transmitir tanto el resto como se presenta (lado izquierdo del resto enlazado en el lado izquierdo tal como está escrito, lado derecho del resto enlazado en el lado derecho tal como está escrito) y el inverso del resto tal como se presenta (lado izquierdo del resto enlazado en el lado derecho tal como está escrito, el lado derecho del resto enlazado en el lado izquierdo tal como está escrito).
- Los términos "enlace" y "ausente" se usan en el presente documento para describir una variable que no incluye un átomo o átomos. Por lo tanto, cuando se dice que una variable divalente está "ausente" se entiende que los restos adyacentes están unidos entre sí. Por ejemplo, si L^{B2} está ausente se entiende que L^{B1} puede estar unido a L^{B3}; o si L^{B1} y yo^{B2} ambos están ausentes se entiende que L^A puede estar unido a L^{B3}. De manera similar, si una variable divalente se define como un "enlace", se entiende que esto significa que no hay átomos presentes y que los restos adyacentes están unidos entre sí. Por lo tanto, por ejemplo, cuando la variable "D" se define como un enlace, se
- 25 aprecia que los carbonos adyacentes a D (en la estructura que define T²) están unidos entre sí. Se entiende que una variable monovalente ausente es un hidrógeno o un par de electrones capaz de una unión covalente adicional.

La unidad de anticuerpo (A, Ab o AB)

- Como se indica anteriormente, el término "anticuerpo" (o "A", "Ab" o "AB") se usa en el presente documento en el sentido más amplio y abarca específicamente anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoespecíficos, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpos que presentan la actividad biológica deseada. Además, mientras que ciertos aspectos de la invención descritos en el presente documento se refieren a conjugados de anticuerpo-fármaco, se prevé además que la porción de anticuerpo del conjugado podría reemplazarse con cualquier cosa que se una específicamente o que se asocie o forme complejos reactivamente con un receptor, antígeno u otro resto receptivo asociado con una población de células diana dada. Por ejemplo, en lugar de contener un anticuerpo, los conjugados de la invención podrían contener una molécula de direccionamiento que se une a, forma complejos con, o reacciona con un receptor, antígeno u otro resto receptivo de una población celular que se busca que sea terapéuticamente o biológicamente modificada. Los ejemplos de tales moléculas incluyen proteínas de menor peso molecular, polipéptido o péptidos, lectinas, glucoproteínas, no péptidos, vitaminas, moléculas de transporte de nutrientes (tales como, pero no limitado a transferrina), o cualquier otra molécula o sustancia de unión celular. En determinados aspectos, el anticuerpo u otra molécula dirigida de este tipo actúa para administrar un fármaco a la población de células diana particular con la que interactúa el anticuerpo u otra molécula de direccionamiento.

- En otro aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de conjugado de anticuerpo-fármaco en el que el anticuerpo AB se selecciona de: trastuzumab, mutantes de trastuzumab (por ejemplo, los mutantes de trastuzumab desvelados en el presente documento o en la solicitud de patente internacional PCT/IB2012/056234), oregovomab, edrecolomab, cetuximab, un anticuerpo monoclonal humanizado para el receptor de vitronectina ($\alpha_v\beta_3$), alemtuzumab, anticuerpos anti-HLA-DR que incluyen un anticuerpo anti-HLA-DR humanizado para el tratamiento del linfoma no de Hodgkin, 131I Lym-1, anticuerpos anti-HLA-Dr10 que incluyen un anticuerpo anti-HLA-Dr10 de murino para el tratamiento del linfoma no de Hodgkin, anticuerpos anti-cd33, anticuerpos anti-cd22 que incluyen un mAAb anti-CD22 humanizado para el tratamiento de la enfermedad de Hodgkin o el linfoma no de Hodgkin, labetuzumab, bevacizumab, ibritumomab tiuxetán, ofatumumab, panitumumab, rituximab, tositumomab, ipilimumab y gemtuzumab.

- Los heteroátomos que puedan estar presentes en una unidad de anticuerpos incluyen azufre (en una realización, de un grupo sulfhidrido de un anticuerpo), oxígeno (en una realización, de un grupo carbonilo, carboxilo o hidroxilo de un anticuerpo) y nitrógeno (en una realización, de un grupo amino primario o secundario de un anticuerpo). Estos heteroátomos pueden estar presentes en el anticuerpo en el estado natural del anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo

natural, o puede introducirse en el anticuerpo mediante modificación química.

En una realización, una unidad de anticuerpo tiene un grupo sulfhidrilo y la unidad de anticuerpo se une a través del átomo de azufre del grupo sulfhidrilo.

5 En otra realización, el anticuerpo tiene restos de lisina que pueden reaccionar con los ésteres activados (tales ésteres incluyen, entre otros, N-hidroxisuccinimida, pentafluorofenilo y ésteres de p-nitrofenilo) y, por lo tanto, forman un enlace amida que consiste en el átomo de nitrógeno de la unidad de anticuerpo y un carbonilo.

En otro aspecto más, la unidad de anticuerpo tiene uno o más restos de lisina que pueden modificarse químicamente para introducir uno o más grupos sulfhidrilo. Los reactivos que se pueden usar para modificar lisinas incluyen, aunque sin limitación, N-succinimidil S-acetiltioacetato (SATA) y clorhidrato de 2-iminotiolano (reactivo de Traut).

10 En otra realización, la unidad de anticuerpos puede tener uno o más grupos de carbohidratos que pueden modificarse químicamente para tener uno o más grupos sulfhidrilo.

15 En otra realización más, la unidad de anticuerpos puede tener uno o más grupos de carbohidratos que pueden oxidarse para proporcionar un grupo aldehído (véase, por ejemplo, Laguzza y col., 1989, J. Med. Chem. 32(3):548-55). El correspondiente aldehído puede formar un enlace con un sitio reactivo tal como, por ejemplo, hidrazina e hidroxilamina. Otros protocolos para la modificación de proteínas para la unión o asociación de fármacos se describen en Coligan y col., Current Protocols in Protein Science, vol. 2, John Wiley y Sons (2002).

20 Cuando los conjugados comprenden proteínas no inmunorreactivas, polipéptidos, o unidades peptídicas en lugar de un anticuerpo, la proteína no inmunorreactiva útil, el polipéptido, o las unidades peptídicas incluyen, aunque sin limitación, transferrina, factores de crecimiento epidérmico ("EGF"), bombesina, gastrina, péptido liberador de gastrina, factor de crecimiento derivado de plaquetas, IL-2, IL-6, factores de crecimiento transformadores ("TOP"), tales como TGF- α y TGF- β , factor de crecimiento de vaccinia ("VGF"), factores de crecimiento de insulina y de tipo insulina I y II, somatostatina, lectinas y apoproteína de lipoproteína de baja densidad.

25 Los anticuerpos policlonales útiles son poblaciones heterogéneas de moléculas de anticuerpos derivadas de los sueros de animales inmunizados. Los anticuerpos monoclonales útiles son poblaciones homogéneas de anticuerpos para un determinante antigénico particular (por ejemplo, un antígeno de células cancerosas, un antígeno vírico, un antígeno microbiano, una proteína, un péptido, un carbohidrato, un compuesto químico, ácido nucleico, o fragmentos de los mismos). Se puede preparar un anticuerpo monoclonal (mAb) contra un antígeno de interés utilizando cualquier técnica conocida en la técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo mediante líneas celulares continuas en cultivo.

30 Los anticuerpos monoclonales útiles incluyen, aunque sin limitación, anticuerpos monoclonales humanos, anticuerpos monoclonales humanizados, fragmentos de anticuerpos o anticuerpos monoclonales quiméricos. Los anticuerpos monoclonales humanos se pueden generar mediante cualquiera de las numerosas técnicas conocidas en la técnica (por ejemplo, Teng y col., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 80:7308-7312; Kozbor y col., 1983, Immunology Today 4:72-79; y Olsson y col., 1982, Meth. Enzymol. 92:3-16).

35 El anticuerpo también puede ser un anticuerpo biespecífico. Los procedimientos para generar anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica y se discuten más adelante.

40 El anticuerpo puede ser un fragmento funcionalmente activo, derivado o análogo de un anticuerpo que se une inmuno-específicamente a las células diana (por ejemplo, antígenos de células cancerosas, antígenos víricos, o antígenos microbianos) u otros anticuerpos que se unen a las células tumorales o matriz. En este sentido, "funcionalmente activo" significa que el fragmento, derivado o análogo es capaz de provocar anticuerpos anti-anti-idiotipo que reconocen el mismo antígeno que el anticuerpo del que se deriva el fragmento, derivado o análogo. De manera específica, En una realización ejemplar, la antigenicidad del idiotipo de la molécula de inmunoglobulina puede potenciarse mediante la eliminación de las secuencias marco y CDR que están en C-terminal a la secuencia de CDR que reconoce específicamente el antígeno. Para determinar qué secuencias de CDR se unen al antígeno, los péptidos 45 sintéticos que contienen las secuencias de CDR pueden usarse en ensayos de unión con el antígeno mediante cualquier procedimiento de ensayo de unión conocido en la técnica (por ejemplo, el ensayo BIA core) (para la ubicación de las secuencias de CDR, véase, por ejemplo, Kabat y col., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta edición, National Institute of Health, Bethesda, Md.; Kabat E y col., 1980, J. Immunology 125(3):961-969).

50 Otros anticuerpos útiles incluyen fragmentos de anticuerpos tales como, aunque no de forma limitativa, fragmentos F(ab')₂, fragmentos Fab, Fvs, anticuerpos de cadena simple, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, scFv, scFv-FV, o cualquier otra molécula con la misma especificidad que el anticuerpo.

55 Además, los anticuerpos recombinantes, tales como los anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados, que comprenden porciones tanto humanas como no humanas, que se pueden generar usando técnicas convencionales de ADN recombinante, son anticuerpos útiles. Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes porciones proceden de diferentes especies animales, tales como, por ejemplo, aquellos que tienen una región variable derivada de un monoclonal de murino y regiones constantes de inmunoglobulina humana. (Véase, por ejemplo, la patente de

EE.UU. N.º 4.816.567; y la patente de EE.UU. N.º 4.816.397.) Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpos de especies no humanas que tienen una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) de las especies no humanas y una región marco de una molécula de inmunoglobulina humana. (Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 5.585.089). Tales anticuerpos monoclonales humanizados y quiméricos se pueden producir mediante técnicas de ADN recombinante conocidas en la materia, por ejemplo, utilizando los procedimientos descritos en la Publicación Internacional N.º WO 87/02671; la Publicación de Patente Europea N.º 0 184 187; la Publicación de Patente Europea N.º 0 171 496; la Publicación de Patente Europea N.º 0 173 494; la Publicación internacional N.º WO 86/01533; la Patente de EE.UU. N.º 4.816.567; la Publicación de Patente Europea N.º 012 023; Berter y col., 1988, Science 240:1041-1043; Liu y col., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 84:3439-3443; Liu y col., 1987, J. Immunol. 139:3521-3526; Sun y col., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 84:214-218; Nishimura y col., 1987, Cancer. Res. 47:999-1005; Wood y col., 1985, Nature 314:446-449; y Shaw y col., 1988, J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-1559; Morrison, 1985, Science 229:1202-1207; Oi y col., 1986, BioTechniques 4:214; Patente de EE.UU. N.º 5.225.539; Jones y col., 1986, Nature 321:552-525; Verhoeyan y col., 1988, Science 239:1534; y Beidler y col., 1988, J. Immunol. 141:4053-4060.

Los anticuerpos completamente humanos son particularmente deseables y pueden producirse usando ratones transgénicos que son incapaces de expresar genes de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina endógena, pero que pueden expresar genes humanos de cadena pesada y ligera. Los ratones transgénicos se inmunizan de manera normal con un antígeno seleccionado, por ejemplo, todo o una porción de un polipéptido de la invención. Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno pueden obtenerse usando tecnología de hibridoma convencional. Los transgenes de inmunoglobulina humana albergados por los ratones transgénicos se reorganizan durante la diferenciación de los linfocitos B y, posteriormente, se someten a cambio de clase y a mutación somática. Por lo tanto, utilizando dicha técnica, es posible producir anticuerpos IgG, IgA, IgM e IgE terapéuticamente útiles. Para una descripción general de esta tecnología para producir anticuerpos humanos, véase Lonberg y Huszar, 1995, Int. Rev. Immunol. 13:65-93. Para una discusión detallada de esta tecnología para producir anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos y los protocolos para producir dichos anticuerpos, véase, por ejemplo, las Pat. de EE.UU. N.º 5.625.126; 5.633.425; 5.569.825; 5.661.016; 5.545.806. Otros anticuerpos humanos se pueden obtener comercialmente de, por ejemplo, Abgenix, Inc. (ahora Amgen, Freemont, Calif.) y Medarex (Princeton, N.J.).

Los anticuerpos completamente humanos que reconocen un epítipo seleccionado se pueden generar utilizando una técnica denominada "selección guiada". En este enfoque, un anticuerpo monoclonal no humano seleccionado, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, se usa para guiar la selección de un anticuerpo completamente humano que reconoce el mismo epítipo. (Véase, por ejemplo, Jaspers y col., 1994, Biotechnology 12:899-903). Los anticuerpos humanos también se pueden producir usando diversas técnicas conocidas en la materia, incluidas las bibliotecas de presentación en fago (véase, por ejemplo, Hoogenboom y Winter, 1991, J. Mol. Biol. 227:381; Marks y col., 1991, J. Mol. Biol. 222:581; Quan y Carter, 2002, The rise of monoclonal antibodies as therapeutics, In Anti-IgE and Allergic Disease, Jardieu y Fick, eds., Marcel Dekker, Nueva York, N.Y., Capítulo 20, págs. 427-469).

En otras realizaciones, el anticuerpo es una proteína de fusión de un anticuerpo, o un fragmento funcionalmente activo del mismo, por ejemplo, en el que el anticuerpo se fusiona a través de un enlace covalente (por ejemplo, un enlace peptídico), ya sea en el extremo N-terminal o en el extremo C-terminal para una secuencia de aminoácidos de otra proteína (o una porción de la misma, preferentemente) al menos una porción de 10, 20 o 50 aminoácidos de la proteína) que no es de un anticuerpo. Preferentemente, el anticuerpo o fragmento del mismo está unido covalentemente a la otra proteína en el extremo N-terminal del dominio constante.

Los anticuerpos incluyen análogos y derivados que se modifican, es decir, mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula siempre que dicha unión covalente permita que el anticuerpo conserve su inmunoespecificidad de unión al antígeno. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los derivados y análogos de los anticuerpos incluyen aquellos que se han modificado adicionalmente, por ejemplo, mediante glucosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización mediante grupos protectores/bloqueadores conocidos, escisión proteolítica, enlace a una unidad de anticuerpo celular u otra proteína, etc. Cualquiera de las numerosas modificaciones químicas puede llevarse a cabo mediante técnicas conocidas que incluyen, aunque no de forma limitativa, escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica en presencia de tunicamicina, etc. Además, el análogo o derivado puede contener uno o más aminoácidos no naturales.

Los anticuerpos pueden tener modificaciones (por ejemplo, sustituciones, delecciones o adiciones) en restos de aminoácidos que interactúan con los receptores de Fc. En particular, los anticuerpos pueden tener modificaciones en los restos de aminoácidos identificados como implicados en la interacción entre el anti-dominio Fc y el receptor FcRn (véase, por ejemplo, la Publicación Internacional N.º WO 97/34631).

Los anticuerpos inmunoespecíficos para un antígeno de células cancerosas pueden obtenerse comercialmente o se pueden producir mediante cualquier procedimiento conocido por un experto en la técnica, tal como, por ejemplo, la síntesis química o las técnicas de expresión recombinante. Se puede obtener la secuencia de nucleótidos que codifica los anticuerpos inmunoespecíficos para un antígeno de células cancerosas, por ejemplo, de la base de datos GenBank o de una base de datos similar, de publicaciones de referencias, o por clonación y secuenciación convencional.

En una realización específica, se pueden usar anticuerpos conocidos para el tratamiento del cáncer. Los anticuerpos

inmunoespecíficos para un antígeno de células cancerosas pueden obtenerse comercialmente o se pueden producir mediante cualquier procedimiento conocido por un experto en la técnica, tal como, por ejemplo, mediante técnicas de expresión recombinante. Se puede obtener la secuencia de nucleótidos que codifica los anticuerpos inmunoespecíficos para un antígeno de células cancerosas, por ejemplo, de la base de datos GenBank o de una base de datos similar, las publicaciones de referencias, o por clonación y secuenciación convencional. Los ejemplos de anticuerpos disponibles para el tratamiento del cáncer incluyen, aunque sin limitación, OVAREX, que es un anticuerpo murino para el tratamiento del cáncer de ovario; PANOREX (Glaxo Wellcome, NC) que es un anticuerpo IgG_{2a} de murino para el tratamiento del cáncer colorrectal; Cetuximab ERBITUX (Imclone Systems Inc., NY), que es un anticuerpo quimérico IgG anti-EGFR para el tratamiento de cánceres positivos del factor de crecimiento epidérmico, como el cáncer de cabeza y cuello; Vitaxin (MedImmune, Inc., MD) que es un anticuerpo humanizado para el tratamiento del sarcoma; CAMPATH 1/H (Leukosite, MA) que es un anticuerpo humanizado IgG₁ para el tratamiento de leucemia linfocítica crónica (LLC); SMART ID10 (Protein Design Labs, Inc., CA) que es un anticuerpo humanizado anti-HLA-DR para el tratamiento del linfoma no de Hodgkin; ONCOLYM (Techniclone, Inc., CA), que es un anticuerpo anti-HLA-Dr10 de murino radiomarcado para el tratamiento del linfoma no de Hodgkin; ALLOMUNE (BioTransplant, CA), que es un mAb anti-CD2 humanizado para el tratamiento de la enfermedad de Hodgkin o el linfoma no de Hodgkin; y CEACIDE (Immunomedics, NJ), que es un anticuerpo anti-CEA humanizado para el tratamiento del cáncer colorrectal.

En un intento por descubrir dianas celulares eficaces para el diagnóstico y la terapia del cáncer, los investigadores han tratado de identificar polipéptidos transmembrana o de otro tipo asociados a tumores que se expresan específicamente en la superficie de uno o más tipos particulares de células cancerosas en comparación con una o más células no cancerosas normales. A menudo, dichos polipéptidos asociados a tumores se expresan más abundantemente en la superficie de las células cancerosas en comparación con la superficie de las células no cancerosas. La identificación de dichos polipéptidos de antígeno de superficie celular asociados a tumores ha dado lugar a la capacidad de atacar específicamente a las células cancerosas para su destrucción a través de terapias basadas en anticuerpos.

La unidad enlazadora (L)

Un enlazador (a veces denominado "[enlazador]" en el presente documento) es un compuesto bifuncional que puede usarse para enlazar un fármaco y un anticuerpo para formar un conjugado de anticuerpo-fármaco (CAF). Tales conjugados son útiles, por ejemplo, en la formación de inmunokonjugados dirigidos contra antígenos asociados a tumores. Dichos conjugados permiten el suministro selectivo de fármacos citotóxicos a las células tumorales.

En un CAF, el enlazador sirve para unir la carga útil al anticuerpo.

En un aspecto, se introduce una segunda sección de la unidad enlazadora que tiene un segundo sitio reactivo, por ejemplo, un grupo electrófilo que es reactivo con un grupo nucleófilo presente en una unidad de anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo). Los grupos nucleófilos útiles en un anticuerpo incluyen, pero sin limitación, los grupos sulfhidrilo, hidroxilo y amino. El heteroátomo del grupo nucleófilo de un anticuerpo es reactivo con un grupo electrófilo en una unidad enlazadora y forma un enlace covalente con una unidad enlazadora. Los grupos electrófilos útiles incluyen, aunque sin limitación, los grupos maleimida y haloacetamida. El grupo electrófilo proporciona un sitio conveniente para la unión de los anticuerpos.

En otra realización, una unidad enlazadora tiene un sitio reactivo que tiene un grupo nucleófilo que es reactivo con un grupo electrófilo presente en un anticuerpo. Los grupos electrófilos útiles en un anticuerpo incluyen, aunque sin limitación, grupos aldehído y cetona carbonilo. El heteroátomo de un grupo nucleófilo de una unidad enlazadora puede reaccionar con un grupo electrófilico en un anticuerpo y formar un enlace covalente con el anticuerpo. Los grupos nucleófilos útiles en una unidad enlazadora incluyen, aunque sin limitación, hidrazida, oxima, amino, hidrazina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidrazina y arilhidrazida. El grupo electrófilo en un anticuerpo proporciona un sitio conveniente para la unión con una unidad enlazadora.

Los grupos amino funcionales también son sitios reactivos útiles para una unidad enlazadora porque pueden reaccionar con ácido carboxílico o ésteres activados de un compuesto para formar un enlace amida. Por lo general, los compuestos a base de péptidos de la invención pueden prepararse formando un enlace peptídico entre dos o más aminoácidos y/o fragmentos de péptidos. Tales enlaces peptídicos se pueden preparar, por ejemplo, de acuerdo con el procedimiento de síntesis en fase líquida (véase, por ejemplo, Schroder y Lubke, "The Peptides", volumen 1, págs 76-136, 1965, Academic Press) que es bien conocido en el campo de la química de péptidos.

En el contexto de la invención y de otros compuestos desvelados, particularmente pero no limitado a componentes enlazadores tales como L₁, L₂ (incluyendo L₂^A, L₂^B y L₂^C) y L₃, la expresión "seleccionado de uno o más de" o "uno o más de" indica que múltiples componentes, que pueden ser el mismo o diferentes, están o se pueden organizar secuencialmente. Por lo tanto, por ejemplo, L₃ puede ser -alquil C₁₋₆-, -NR- u otros componentes enumerados individualmente, pero también -alquil C₁₋₆-NR-, o cualquier otra combinación de 2 o más componentes listados.

En otra realización, una unidad enlazadora tiene un sitio reactivo que puede reaccionar con nucleófilos de anticuerpos, tales como las cisteínas. El sitio reactivo está compuesto por un heterociclo que está sustituido con una sulfona. La

sulfona se reemplaza luego por el nucleófilo del anticuerpo (es decir, la cisteína) y el enlace recién formado entre el anticuerpo y el heterociclo conecta el anticuerpo con el enlazador. Véase, el documento WO 2014/144878.

Síntesis de compuestos y conjugados de anticuerpo-fármaco de los mismos

Los compuestos y conjugados de la invención y otros compuestos desvelados se pueden preparar usando los procedimientos de síntesis desvelados a continuación en la Ejemplificación. Tal como se describe con más detalle a continuación, los compuestos y conjugados de la invención pueden prepararse usando una sección de una unidad enlazadora que tiene un sitio reactivo para la unión al compuesto. En un aspecto, se introduce una segunda sección de la unidad enlazadora que tiene un segundo sitio reactivo, por ejemplo, un grupo electrófilo que es reactivo con un grupo nucleófilo presente en una unidad de anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo). Los grupos nucleófilos útiles en un anticuerpo incluyen, pero sin limitación, los grupos sulfhidrilo, hidroxilo y amino. El heteroátomo del grupo nucleófilo de un anticuerpo es reactivo con un grupo electrófilo en una unidad enlazadora y forma un enlace covalente con una unidad enlazadora. Los grupos electrófilos útiles incluyen, aunque sin limitación, los grupos maleimida y haloacetamida. El grupo electrófilo proporciona un sitio conveniente para la unión de los anticuerpos.

En otra realización, una unidad enlazadora tiene un sitio reactivo que tiene un grupo nucleófilo que es reactivo con un grupo electrófilo presente en un anticuerpo. Los grupos electrófilos útiles en un anticuerpo incluyen, aunque sin limitación, grupos aldehído y cetona carbonilo. El heteroátomo de un grupo nucleófilo de una unidad enlazadora puede reaccionar con un grupo electrófilico en un anticuerpo y formar un enlace covalente con el anticuerpo. Los grupos nucleófilos útiles en una unidad enlazadora incluyen, aunque sin limitación, hidrazida, oxima, amino, hidrazina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidrazina y arilhidrazida. El grupo electrófilo en un anticuerpo proporciona un sitio conveniente para la unión con una unidad enlazadora.

Los grupos amino funcionales también son sitios reactivos útiles para una unidad enlazadora porque pueden reaccionar con ácido carboxílico o ésteres activados de un compuesto para formar un enlace amida. Por lo general, los compuestos a base de péptidos de la invención pueden prepararse formando un enlace peptídico entre dos o más aminoácidos y/o fragmentos de péptidos. Tales enlaces peptídicos se pueden preparar, por ejemplo, de acuerdo con el procedimiento de síntesis en fase líquida (véase, por ejemplo, Schroder y Lubke, "The Peptides", volumen 1, págs 76-136, 1965, Academic Press) que es bien conocido en el campo de la química de péptidos.

Tal como se describe con más detalle a continuación, los conjugados pueden prepararse usando una sección del enlazador que tiene un sitio reactivo para la unión a un compuesto de la invención e introducir otra sección de la unidad enlazadora que tiene un sitio reactivo para un anticuerpo. En un aspecto, una unidad enlazadora tiene un sitio reactivo que tiene un grupo electrófilo que es reactivo con un grupo nucleófilo presente en una unidad de anticuerpos, tal como un anticuerpo. El grupo electrófilo proporciona un sitio conveniente para la unión de los anticuerpos. Los grupos nucleófilos útiles en un anticuerpo incluyen, pero sin limitación, los grupos sulfhidrilo, hidroxilo y amino. El heteroátomo del grupo nucleófilo de un anticuerpo es reactivo con un grupo electrófilo en una unidad enlazadora y forma un enlace covalente con una unidad enlazadora. Los grupos electrófilos útiles incluyen, aunque sin limitación, los grupos maleimida y haloacetamida.

En otra realización, una unidad enlazadora tiene un sitio reactivo que tiene un grupo nucleófilo que es reactivo con un grupo electrófilo presente en una unidad de anticuerpo. El grupo electrófilo en un anticuerpo proporciona un sitio conveniente para la unión con una unidad enlazadora. Los grupos electrófilos útiles en un anticuerpo incluyen, aunque sin limitación, grupos aldehído y cetona carbonilo. El heteroátomo de un grupo nucleófilo de una unidad enlazadora puede reaccionar con un grupo electrófilico en un anticuerpo y formar un enlace covalente con el anticuerpo. Los grupos nucleófilos útiles en una unidad enlazadora incluyen, aunque sin limitación, hidrazida, oxima, amino, hidrazina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidrazina y arilhidrazida.

En otra realización de la invención, el enlace de la presente invención emplea un polipéptido de dominio constante de anticuerpo diseñado genéticamente, o una porción del mismo, en la que el dominio constante diseñado genéticamente comprende al menos una sustitución de aminoácidos para introducir un resto de cisteína útil para la conjugación, y en el que el polipéptido de dominio constante es un polipéptido del dominio constante (Cy) de cadena pesada de IgG humana diseñada genéticamente, o una porción del mismo, que comprende al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en K246, D249, D265, S267, D270, N276, Y278, E283, R292, E293, E294, Y300, V302, V303, L314, N315, E318, K320, I332, E333, K334, I336, E345, Q347, S354, R355, M358, K360, Q362, K370, Y373, D376, A378, E380, E382, Q386, E388, N390, K392, T393, D401, F404, T411, D413, K414, R416, Q418, Q419, N421, M428, A431, L432, T437, Q438, K439, L443 y S444, según el índice EU de Kabat.

En otra realización de la invención, el enlace de la presente invención emplea un polipéptido de dominio constante de anticuerpo diseñado genéticamente, o una porción del mismo, en el que el dominio constante diseñado genéticamente comprende al menos una sustitución de aminoácidos para introducir un resto de cisteína útil para la conjugación, y en el que el polipéptido de dominio constante es un polipéptido de dominio constante de cadena ligera (CA) lambda humana diseñada genéticamente, o una porción del mismo, que comprende al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en K110, A111, L125, K149C, V155, G158, T161, Q185, S188, H189, S191, T197, V205, E206, K207, T208 y A210, según la numeración de Kabat.

En otra realización más de la invención, el enlace de la presente invención emplea un polipéptido de dominio constante de anticuerpo modificado, o una porción del mismo, en el que el dominio constante diseñado genéticamente comprende al menos una sustitución de aminoácidos para introducir un resto de cisteína útil para la conjugación, y en el que el polipéptido de dominio constante es un polipéptido de dominio constante de cadena ligera kappa (CK) humana diseñada genéticamente, o una porción del mismo, que comprende al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en A111, K183 y N210, según la numeración de Kabat.

En otra realización más de la invención, el enlace de la presente invención emplea un polipéptido de dominio constante de anticuerpo modificado, o una porción del mismo, en el que el dominio constante diseñado genéticamente comprende al menos una sustitución de aminoácidos para introducir un resto de cisteína útil para la conjugación, y en el que el polipéptido de dominio constante es un polipéptido Cy diseñado genéticamente, o una porción del mismo, que comprende al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en una secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 97-100, 102, 104, 107-127 y 129-163, tal como se desvela en el documento WO2013/093809.

En otra realización más de la invención, el enlace de la presente invención emplea un polipéptido de dominio constante de anticuerpo diseñado genéticamente, o una porción del mismo, en la que el dominio constante modificado comprende al menos una sustitución de aminoácidos para introducir un resto de cisteína útil para la conjugación, y en el que el polipéptido de dominio constante es un polipéptido CK diseñado genéticamente, o una porción del mismo, que comprende al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en una secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 90, 92, 95, 164, 166 y 169, tal como se desvela en el documento WO2013/093809.

En otra realización más de la invención, el enlace de la presente invención emplea un polipéptido de dominio constante de anticuerpo diseñado genéticamente, o una porción del mismo, en la que el dominio constante modificado comprende al menos una sustitución de aminoácidos para introducir un resto de cisteína útil para la conjugación, y en el que el polipéptido de dominio constante es un polipéptido CA diseñado genéticamente, o una porción del mismo, que comprende al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en una secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 172-186, tal como se desvela en el documento WO2013/093809.

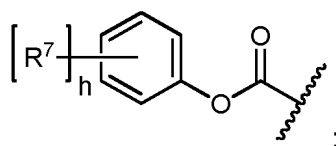
En otra realización de la invención, el polipéptido Cy diseñado genéticamente anteriormente mencionado comprende además al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en una mutación en la posición de aminoácido 284, 287, A327, N384, L398 y V422, según el índice EU de Kabat.

Conjugación con transglutaminasa

En ciertas realizaciones, un compuesto de la invención puede reticularse covalentemente con un polipéptido diseñado genéticamente que contiene Fc o Fab con un marcador que contiene glutamina donadora de acilo (por ejemplo, marcadores de péptido que contienen Gln o marcadores Q) o una glutamina endógena reactiva (es decir, la capacidad de formar un enlace covalente como donador de acilo en presencia de una amina y una transglutaminasa) mediante diseño genético de polipéptidos (por ejemplo, mediante delección, inserción, sustitución, mutación de aminoácidos o cualquier combinación de los mismos en el polipéptido), en presencia de transglutaminasa, siempre que el compuesto de la invención comprenda un agente donador de amina (por ejemplo, una molécula pequeña que comprende o está unida a una amina reactiva), formando de este modo una población estable y homogénea de un conjugado de polipéptido que contiene Fc diseñado genéticamente con un agente donador de amina que está conjugado específicamente en el sitio con el polipéptido que contiene Fc o que contiene Fab a través del marcador que contiene glutamina donadora de acilo o la glutamina endógena expuesta/accesible/reactiva. Por ejemplo, los compuestos de la invención pueden conjugarse tal como se describe en la Solicitud de Patente Internacional de N.º de serie PCT/IB2011/054899. En ciertas realizaciones, para facilitar la conjugación del compuesto de la invención a un polipéptido que contiene Fc o Fab diseñado genéticamente con un marcador que contiene glutamina donante de acilo o una glutamina endógena hecha reactiva por diseño genético de polipéptidos en presencia de transglutaminasa, Z es NH₂.

Conjugación con la región constante del dominio kappa de la cadena ligera humana

En ciertas realizaciones, un compuesto de la invención puede unirse covalentemente a la cadena lateral de K¹⁸⁸ de la región constante del dominio kappa de la cadena ligera humana (CLK) (numeración de la cadena ligera completa según Kabat). Por ejemplo, los compuestos de la invención pueden conjugarse tal como se describe en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos de Número de Serie 13/180.204. En ciertas realizaciones, para facilitar la conjugación con K188 CLK, Z es



R⁷ se selecciona independientemente cada vez que está presente entre el grupo que consiste en F, Cl, I, Br, NO₂, CN

y CF₃; y h es 1, 2, 3, 4 o 5.

En ciertas realizaciones, la invención proporciona una composición que comprende un compuesto de la invención conjugado covalentemente con un anticuerpo (o una porción de unión a antígeno del mismo), en el que al menos aproximadamente el 50 %, o al menos aproximadamente el 60 %, o al menos aproximadamente el 70 %, o al menos aproximadamente el 80 %, o al menos aproximadamente el 90 % del compuesto de la invención en la composición se conjuga con el anticuerpo o la porción de unión antígeno del mismo en K¹⁸⁸ CLk.

En ciertas realizaciones, los compuestos de la invención pueden conjugarse con el sitio de combinación de un anticuerpo catalítico, tal como anticuerpos de aldolasa, o la porción de unión a antígeno de los mismos. Los anticuerpos de aldolasa contienen porciones de sitio de combinación que, cuando no están comprometidas (por ejemplo, por conjugación), catalizan una reacción de adición de aldol entre un donante de cetona alifática y un aceptor de aldehído. El contenido de la Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. N.º US 2006/205670, en particular las páginas 78-118 que describen enlazadores, y los párrafos [0153]-[0233] que describen anticuerpos, fragmentos útiles, variantes y modificaciones de los mismos, h38C2, sitios de combinación y regiones determinantes de complementariedad (CDR), y tecnología de anticuerpos relacionada. La expresión "sitio de combinación" generalmente incluye las CDR y los restos de la región marco adyacentes que están implicados en la unión al antígeno.

Composiciones y procedimientos de administración

En otras realizaciones, otro aspecto de la invención se refiere a composiciones farmacéuticas que incluyen una cantidad eficaz de un compuesto de la invención y/o un conjugado de anticuerpo-fármaco del mismo y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones, las composiciones son adecuadas para la administración veterinaria o humana.

Las presentes composiciones farmacéuticas pueden estar en cualquier forma que permita que la composición se administre a un paciente. Por ejemplo, la composición puede estar en forma de un sólido o de un líquido. Las vías de administración típicas incluyen, aunque sin limitación, la administración parenteral, ocular e intratumoral. La administración parenteral incluye inyecciones subcutáneas, intravenosas, la inyección intramuscular o intraesternal o técnicas de infusión. En un aspecto, las composiciones se administran por vía parenteral. En una realización específica, las composiciones se administran por vía intravenosa.

Las composiciones farmacéuticas pueden formularse para permitir que un compuesto de la invención y/o un conjugado de anticuerpo-fármaco del mismo esté biodisponible tras la administración de la composición a un paciente. Las composiciones pueden tomar la forma de una o más unidades de dosificación, en las que, por ejemplo, un comprimido puede ser una unidad de dosificación única, y un recipiente de un compuesto de la invención y/o un conjugado de anticuerpo-fármaco del mismo en forma líquida puede contener una pluralidad de unidades de dosificación.

Los materiales utilizados en la preparación de las composiciones farmacéuticas pueden ser no tóxicos en las cantidades utilizadas. Será evidente para los expertos en la materia que la dosificación óptima del principio o los principios activos en la composición farmacéutica dependerá de una variedad de factores. Los factores relevantes incluyen, aunque sin limitación, el tipo de animal (por ejemplo, el ser humano), la forma particular del compuesto de la invención y/o el conjugado del anticuerpo-fármaco del mismo, el modo de administración y la composición empleada.

El vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable puede ser sólido o particulado, para que las composiciones estén, por ejemplo, en forma de comprimidos o en polvo. El o los vehículos pueden ser líquidos. Además, el o los vehículos pueden ser particulados.

La composición puede estar en forma de un líquido, por ejemplo, una solución, emulsión o suspensión. En una composición para administración por inyección, uno o más de un tensioactivo, conservante, agente humectante, agente dispersante, agente de suspensión, tampón, estabilizante y agente isotónico también se pueden incluir.

Las composiciones líquidas, tanto si son soluciones, como suspensiones u otra forma similar, también pueden incluir uno o más de los siguientes: diluyentes estériles tales como agua para inyección, solución salina, preferentemente, solución salina fisiológica, solución de Ringer, cloruro de sodio isotónico, aceites fijos tales como mono o diglicéridos sintéticos que pueden servir como disolvente o medio de suspensión, polietilenglicoles, glicerina, ciclodextrina, propilenglicol u otros disolventes; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones tales como acetatos, citratos, fosfatos o aminoácidos, y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. Una composición parenteral puede estar encapsulada en una ampolla, una jeringa desechable o un frasco de dosis múltiples hecho de vidrio, plástico u otro material. La solución salina fisiológica es un adyuvante ejemplar. Una composición inyectable es preferentemente estéril.

La cantidad de un compuesto de la invención y/o conjugado de anticuerpo-fármaco del mismo que es eficaz en el tratamiento de un trastorno o afección particular dependerá de la naturaleza del trastorno o afección, y puede determinarse mediante técnicas clínicas convencionales. Además, los ensayos *in vitro* o *in vivo* se pueden emplear opcionalmente para ayudar a identificar intervalos de dosificación óptimos. La dosis precisa que se empleará en las composiciones también dependerá de la vía de administración y la gravedad de la enfermedad o trastorno, y debe

decidirse de acuerdo con el criterio del médico y las circunstancias de cada paciente.

Las composiciones comprenden una cantidad eficaz de un compuesto de la invención y/o un conjugado de anticuerpo-fármaco del mismo de modo que se obtenga una dosificación adecuada. Por lo general, esta cantidad es al menos aproximadamente el 0,01 % de un compuesto de la invención y/o de un conjugado de anticuerpo-fármaco del mismo en peso de la composición. En una realización ejemplar, las composiciones farmacéuticas se preparan de manera que una unidad de dosificación parenteral contenga de aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el 2 % en peso de la cantidad de un compuesto de la invención y/o un conjugado de anticuerpo-fármaco del mismo.

Para la administración intravenosa, la composición puede comprender de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 100 mg de un compuesto de la invención y/o conjugado de anticuerpo-fármaco del mismo por kg del peso corporal del paciente. En un aspecto, la composición puede incluir de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 mg de un compuesto de la invención y/o conjugado de anticuerpo-fármaco del mismo por kg del peso corporal del paciente. En otro aspecto, la cantidad administrada estará en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 25 mg/kg de peso corporal de un compuesto de la invención y/o conjugado de anticuerpo-fármaco del mismo.

Generalmente, la dosificación de un compuesto de la invención y/o conjugado de anticuerpo-fármaco del mismo administrado a un paciente es típicamente de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg del peso corporal del paciente. En un aspecto, la dosis administrada a un paciente está entre aproximadamente 0,01 mg/kg y aproximadamente 10 mg/kg del peso corporal del paciente. En otro aspecto, la dosis administrada a un paciente está entre aproximadamente 0,1 mg/kg y aproximadamente 10 mg/kg del peso corporal del paciente. En otro aspecto más, la dosis administrada a un paciente está entre aproximadamente 0,1 mg/kg y aproximadamente 5 mg/kg del peso corporal del paciente. En otro aspecto más, la dosis administrada está entre aproximadamente 0,1 mg/kg y aproximadamente 3 mg/kg del peso corporal del paciente. En otro aspecto más, la dosis administrada es de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg del peso corporal del paciente.

Un compuesto de la invención y/o un conjugado de anticuerpo-fármaco del mismo pueden administrarse por cualquier vía conveniente, por ejemplo por infusión o inyección en bolo. La administración puede ser sistémica o local. Se conocen varios sistemas de administración, por ejemplo, encapsulación en liposomas, mieropartículas, microcápsulas, cápsulas, etc., y puede usarse para administrar un compuesto de la invención y/o un conjugado de anticuerpo-fármaco del mismo. En ciertas realizaciones, se administra a un paciente más de un compuesto de la invención y/o conjugado de anticuerpo-fármaco del mismo.

En realizaciones específicas, puede ser deseable administrar uno o más compuestos de la invención y/o conjugados de anticuerpo-fármaco de los mismos localmente al área que necesita tratamiento. Esto se puede lograr, por ejemplo, y no a modo de limitación, por infusión local durante la cirugía; aplicación tópica, por ejemplo, junto con un apósito para heridas después de la cirugía; por inyección; por medio de un catéter; o por medio de un implante, siendo el implante de un material poroso, no poroso o gelatinoso, incluyendo membranas, tales como membranas sialásticas o fibras. En una realización, la administración puede ser por inyección directa en el sitio (o en el sitio anterior) de un cáncer, tumor o tejido neoplásico o preneoplásico. En otra realización, la administración puede ser por inyección directa en el sitio (o en el sitio anterior) de una manifestación de una enfermedad autoinmune.

En otra realización más, el compuesto de la invención y/o el conjugado de anticuerpo-fármaco del mismo se puede administrar en un sistema de liberación controlada, tal como, pero sin limitación, una bomba, o se pueden usar diversos materiales poliméricos. En otra realización más, se puede colocar un sistema de liberación controlada cerca de la diana del compuesto de la invención y/o del conjugado de anticuerpo-fármaco del mismo, por ejemplo, el hígado, requiriendo por lo tanto solo una parte de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, en *Medical Applications of Controlled Release*, citado anteriormente, vol. 2, págs. 115-138 (1984)). Se pueden utilizar otros sistemas de liberación controlada tratados en la revisión de Langer (*Science* 249:1527-1533 (1990)).

El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante o excipiente, con el que se administra un compuesto o conjugado de anticuerpo-fármaco del mismo. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos, tales como agua y aceites, incluidos los de origen del petróleo, animal, vegetal o sintético. Los vehículos pueden ser solución salina, y similares. Además, se pueden usar agentes auxiliares, estabilizantes y otros agentes. En una realización, cuando se administra a un paciente, el compuesto o conjugado y los vehículos farmacéuticamente aceptables son estériles. El agua es un vehículo ejemplar cuando el compuesto o el conjugado se administran por vía intravenosa. Se pueden emplear también soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol como vehículos líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Las presentes composiciones, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponantes del pH.

Las presentes composiciones pueden tomar la forma de soluciones, microgránulos, polvos, formulaciones de liberación sostenida, o cualquier otra forma adecuada para su uso. Otros ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E. W. Martin.

En una realización, el compuesto de la invención y/o el conjugado de anticuerpo-fármaco del mismo se formulan de acuerdo con procedimientos habituales tales como una composición farmacéutica adaptada para administración intravenosa a animales, particularmente seres humanos. Por lo general, los vehículos o excipientes para la

administración intravenosa son soluciones tampón acuosas isotónicas estériles. Cuando sea necesario, las composiciones también pueden incluir un agente solubilizante. Las composiciones para la administración intravenosa pueden comprender opcionalmente un anestésico local tal como lignocaína para aliviar el dolor en el sitio de la inyección. Generalmente, los ingredientes se suministran por separado o se mezclan en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como polvo liofilizado seco o concentrado libre de agua en un recipiente sellado herméticamente, tal como una ampolla o bolsita que indica la cantidad de agente activo. Cuando un compuesto de la invención y/o un conjugado de anticuerpo-fármaco del mismo se va a administrar por infusión, se puede dispensar, por ejemplo, con una botella de infusión que contenga agua estéril de grado farmacéutico o solución salina. Cuando el compuesto de la invención y/o el conjugado de anticuerpo-fármaco del mismo se administra mediante inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina para que los ingredientes se puedan mezclar antes de la administración.

La composición puede incluir diversos materiales que modifican la forma física de una unidad de dosificación sólida o líquida. Por ejemplo, la composición puede incluir materiales que forman una capa de recubrimiento alrededor de los principios activos. Los materiales que forman la cubierta del revestimiento son típicamente inertes y pueden seleccionarse de, por ejemplo, azúcar, goma laca y otros agentes de recubrimiento entérico. Como alternativa, los principios activos se pueden encerrar en una cápsula de gelatina.

Ya sea en forma sólida o líquida, las presentes composiciones pueden incluir un agente farmacológico utilizado en el tratamiento del cáncer.

Usos terapéuticos de compuestos y conjugados de anticuerpo-fármaco de los mismos

Otro aspecto de la invención se relaciona con los compuestos de la invención y sus conjugados de anticuerpo-fármaco para su uso en el tratamiento del cáncer.

Los compuestos de la invención y/o sus conjugados de anticuerpo-fármaco son útiles para inhibir la multiplicación de una célula tumoral o célula cancerosa, causando la apoptosis en una célula tumoral o cancerosa, o para tratar el cáncer en un paciente. Los compuestos de la invención y/o sus conjugados de anticuerpo-fármaco pueden usarse en consecuencia en una variedad de entornos para el tratamiento de cánceres de animales. Dichos conjugados se pueden usar para administrar un compuesto de la invención a una célula tumoral o a una célula cancerosa. Sin quedar ligados a teoría alguna, en una realización, el anticuerpo del conjugado se une o se asocia con una célula cancerosa o un antígeno asociado a células tumorales, y el conjugado puede ser absorbido (internalizado) dentro de una célula tumoral o célula cancerosa a través de la endocitosis mediada por receptor u otro mecanismo de internalización. El antígeno puede unirse a una célula tumoral o célula cancerosa o puede ser una proteína de matriz extracelular asociada con la célula tumoral o célula cancerosa. En ciertas realizaciones, una vez dentro de la célula, una o más secuencias peptídicas específicas se cortan enzimática o hidrolíticamente por una o más proteasas asociadas a células tumorales o cancerosas, dando como resultado la liberación de un compuesto de la invención del conjugado. El compuesto de la invención liberado es libre de migrar dentro de la célula e inducir actividades citotóxicas o citostáticas. El conjugado también se puede escindir mediante una proteasa intracelular para liberar un compuesto de la invención. En una realización alternativa, el compuesto de la invención se escinde del conjugado fuera de la célula tumoral o la célula cancerosa, y el compuesto de la invención penetra posteriormente en la célula.

En ciertas realizaciones, los conjugados proporcionan un tumor específico de conjugación o un fármaco dirigido contra el cáncer, reduciendo así la toxicidad general de los compuestos de la invención.

En otra realización, la unidad de anticuerpo se une a la célula tumoral o a la célula cancerosa.

En otra realización, la unidad de anticuerpo se une a una célula tumoral o al antígeno de células cancerosas que está en la superficie de la célula tumoral o de la célula cancerosa.

En otra realización, la unidad de anticuerpo se une a una célula tumoral o al antígeno de células cancerosas que es una proteína de matriz extracelular asociada con la célula tumoral o con la célula cancerosa.

La especificidad de la unidad de anticuerpo para una célula tumoral o célula cancerosa particular puede ser importante para determinar aquellos tumores o cánceres que se tratan con mayor eficacia.

Los tipos particulares de cánceres que pueden tratarse con un compuesto de la invención y/o conjugado de anticuerpo-fármaco del mismo, incluyen pero no se limitan a, carcinomas de vejiga, mama, cuello del útero, colon, endometrio, riñón, pulmón, esófago, ovario, próstata, páncreas, piel, estómago y testículos; y cánceres de sangre que incluyen, pero no se limitan a, leucemias y linfomas.

Terapia multimodal para el cáncer. Los cánceres, incluyendo, aunque no de forma limitativa, un tumor, metástasis u otra enfermedad o trastorno caracterizado por un crecimiento celular descontrolado, se pueden tratar o inhibir mediante la administración de un compuesto de la invención y/o de un conjugado de anticuerpo-fármaco del mismo.

En otras realizaciones, se proporcionan compuestos de la invención y conjugados de anticuerpo-fármaco para su uso en el tratamiento del cáncer, incluyendo la administración a un paciente que lo necesite de una cantidad eficaz de un

compuesto de la invención y/o un conjugado de anticuerpo-fármaco del mismo y un agente quimioterapéutico. En una realización, el agente quimioterapéutico es aquel con el que no se ha descubierto que el tratamiento del cáncer sea refractario. En otra realización, el agente quimioterapéutico es aquel con el que se ha descubierto que el tratamiento del cáncer es refractario. Un compuesto de la invención y/o el conjugado de anticuerpo-fármaco del mismo se puede administrar a un paciente que también se ha sometido a cirugía como tratamiento para el cáncer.

En algunas realizaciones, el paciente también recibe un tratamiento adicional, tal como radioterapia. En una realización específica, el compuesto de la invención y/o el conjugado de anticuerpo-fármaco del mismo se administra simultáneamente con el agente quimioterapéutico o con radioterapia. En otra realización específica, el agente quimioterapéutico o la radioterapia se administran antes o después de la administración de un compuesto de la invención y/o del conjugado de anticuerpo-fármaco del mismo.

Se puede administrar un agente quimioterapéutico durante una serie de sesiones. Cualquiera o una combinación de los agentes quimioterapéuticos, tales agentes quimioterapéuticos de tratamiento habitual, se pueden administrar.

Además, un compuesto de la invención y/o un conjugado de anticuerpo-fármaco del mismo para su uso en el tratamiento del cáncer se proporcionan como una alternativa a la quimioterapia o radioterapia en la que la quimioterapia o la radioterapia han demostrado o pueden demostrar ser demasiado tóxicas, por ejemplo, resultados de efectos secundarios inaceptables o insoportables, para el sujeto que se está tratando. El paciente que está siendo tratado puede, opcionalmente, ser tratado con otro tratamiento contra el cáncer tal como cirugía, radioterapia o quimioterapia, dependiendo de qué tratamiento se considere aceptable o soportable.

Los compuestos de la invención y/o sus conjugados de anticuerpo-fármaco también se pueden usar de forma *in vitro* o ex vivo, tal como para el tratamiento de ciertos tipos de cáncer, incluyendo, pero sin limitación, leucemias y linfomas, implicando dicho tratamiento los trasplantes autólogos de células madre. Esto puede implicar un procedimiento de varias etapas en el que las células madre hematopoyéticas autólogas del animal se recolectan y se purgan de todas las células cancerosas, la población de células de médula ósea restante del animal se erradica a través de la administración de una dosis alta de un compuesto de la invención y/o de un conjugado de anticuerpo-fármaco del mismo con o sin radioterapia de dosis alta, y el injerto de células madre se infunde nuevamente en el animal. Luego se brinda atención de apoyo mientras se restaura la función de la médula ósea y el paciente se recupera.

La invención se describe adicionalmente en los siguientes ejemplos y ejemplos de referencia.

Procedimientos generales

Procedimientos sintéticos experimentales:

Los experimentos se realizaron generalmente en una atmósfera inerte (nitrógeno o argón), especialmente en los casos en los que se emplearon reactivos o intermedios sensibles al oxígeno o a la humedad. Generalmente, se usaron disolventes y reactivos comerciales sin purificación adicional, incluyendo disolventes anhidros, cuando era apropiado (generalmente productos Sure-Seal™ de la Aldrich Chemical Company, Milwaukee, Wisconsin). Los datos de espectrometría de masas se indican a partir de cromatografía líquida-espectrometría de masas (CL-EM) o de ionización química a presión atmosférica (IQPA). Los desplazamientos químicos en los datos de resonancia magnética nuclear (RMN) se expresan en partes por millón (ppm, δ) referidos a los picos residuales de los disolventes deuterados utilizados.

Para las síntesis que hagan referencia a los procedimientos de otros Ejemplos o Procedimientos, el protocolo de reacción (duración de reacción y temperatura) pueden variar. En general, las reacciones se siguieron por cromatografía de capa fina, CL-EM o HPLC, y se sometieron a tratamiento cuando era apropiado. Las purificaciones pueden variar entre experimentos: por lo general, los disolventes y las proporciones de disolventes usadas para eluyentes/gradientes se seleccionaron para proporcionar tiempos de retención apropiados. A menos que se especifique otra cosa, las fracciones de HPLC de fase inversa se concentraron por liofilización/secado por congelación. Los compuestos intermedios y finales se almacenaron a (0 °C) o a temperatura ambiente en viales o matraces cerrados en una atmósfera de nitrógeno. Los nombres de los compuestos se generaron con software de ACD Labs.

Las abreviaturas para los disolventes y/o reactivos se basan en las directrices de la American Chemical Society y se destacan a continuación:

Ac = Acetilo
 Boc = *N*-*tert*-butoxicarbonilo
 CDI = *N,N'*-Carbonildiimidazol
 DCC = 1,3-Diciclohexilcarbodiimida
 DCE = Dicloroetano
 DCM = Diclorometano
 DEA = *N,N*-Dietilamina
 DEAD = Azodicarboxilato de dietilo
 DIAD = Azodicarboxilato de diisopropilo
 DIBAL-H = Hidruro de diisobutilaluminio

	DIPEA (o) Base de Hunig = <i>N,N</i> -Diisopropiletilamina
	DMA = Dimetilacetamida
	DMAP = 4-Dimetilaminopiridina
	DME = Dimetoxietano
5	DMF = <i>N,N</i> -Dimetilformamida
	DMSO = Dimetilsulfóxido
	DPPA = Difenilfosforil azida
	EDCI = 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
	EtOAc = Acetato de etilo
10	Fmoc = Fluorenilmetiloxycarbonilo
	h = hora
	HATU = Hexafluorofosfato de <i>o</i> -(7-azabenzotriazol-1-il)- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametiluronio
	HBTU = Hexafluorofosfato de <i>N,N,N',N'</i> -Tetrametil- <i>O</i> -(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-il)uronio
	HOAc = Ácido acético
15	HOAt = 1-Hidroxí-7-azabenzotriazol
	HOBt = 1-Hidroxibenzotriazol hidrato
	LDA = Diisopropilamida de litio
	Me = Metilo
	MS = Tamices moleculares
20	MTBE = Metil <i>tert</i> -butil éter
	<i>n</i> -BuLi = <i>n</i> -Butil litio
	NBS = <i>N</i> -Bromosuccinimida
	NMM = <i>N</i> -metil morfolina
	Ph = Fenilo
25	PPTS = <i>p</i> -Toluenosulfonato de piridinio
	<i>p</i> -TsOH = Ácido <i>p</i> -toluenosulfónico
	ta = temperatura ambiente
	TBAI = Yoduro de tetrabutilamonio
	TEA = Trietilamina
30	Tf = Trifluorometanosulfonato
	TFA = TFA
	THF = Tetrahidrofurano
	TPTU = Tetrafluoroborato de <i>O</i> -(2-oxo-1(2 <i>H</i>)piridil)- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametiluronio

Condiciones de HPLC y CL-EM usadas para el análisis

- 35 *Protocolo A*: Columna: Waters Acquity UPLC HSS T3, 2,1 mm x 50 mm, C18, 1,7 µm; Fase móvil A: ácido fórmico al 0,1 % en agua (v/v); Fase móvil B: ácido fórmico al 0,1 % en acetonitrilo (v/v); Gradiente: B al 5 % durante 0,1 minutos, B del 5 % al 95 % durante 2,5 minutos, B al 95 % durante 0,35 minutos; Caudal: 1,25 ml/minuto. Temperatura: 60 °C; Detección: 200-450 nm; intervalo de EM (+) 100-2000 daltons; Volumen de inyección: 5 µl; Instrumento: Waters Acquity.
- 40 *Protocolo B*: Columna: Waters Acquity UPLC HSS T3, C18, 2,1 x 50 mm, 1,7 µm; Fase móvil A: ácido fórmico al 0,1 % en agua (v/v); Fase móvil B: ácido fórmico al 0,1 % en acetonitrilo (v/v); Gradiente: B al 5 % durante 0,1 minutos, B del 5 % al 95 % durante 1,5 minutos, B al 95 % durante 0,35 minutos; Caudal: 1,25 ml/minuto. Temperatura: 60 °C; Detección: 200-450 nm; intervalo de EM (+) 100-2000 daltons; Volumen de inyección: 5 µl; Instrumento: Waters Acquity.

Condiciones de HPLC usadas para la purificación

- 45 *Procedimiento A*: Columna: Phenomenex Luna Fenilhexil 150 x 21,2 mm, 5 µm; Fase móvil A: TFA al 0,02 % en agua (v/v); Fase móvil B: TFA al 0,02 % en acetonitrilo (v/v); Gradiente: B al 20 % durante 1,5 minutos, de B al 20 % a B al 100 % durante 8,5 minutos, después B al 100 % durante 2,0 minutos; Caudal: 27 ml/minuto. Temperatura: no controlada; Detección: DAD 210-360 nm; intervalo de EM (+) 150-2000 daltons; Instrumento: 305 RP Waters Fractional Lynx LCMS
- 50 *Procedimiento B*: Columna: Phenomenex Luna C18, 100 x 30 mm, 5 µm; Fase móvil A: TFA al 0,02 % en agua (v/v); Fase móvil B: TFA al 0,02 % en acetonitrilo (v/v); Gradiente: B al 20 % durante 1,5 minutos, de B al 20 % a B al 100 % durante 8,5 minutos, después B al 95 % durante 2,0 minutos; Caudal: 30 ml/minuto. Temperatura: no controlada; Detección: UV 215 nm; Instrumento: Gilson
- 55 *Procedimiento C*: Phenomenex Luna C18, 100 x 30 mm, 5 µm; Fase móvil A: TFA al 0,02 % en agua (v/v); Fase móvil B: TFA al 0,02 % en acetonitrilo (v/v); Gradiente: variable, gradiente en aumento de B en A durante 10 a 20 minutos. Caudal: de 27 a 30 ml/minuto. Temperatura: no controlada; Detección: UV 215 nm; Instrumento: Gilson

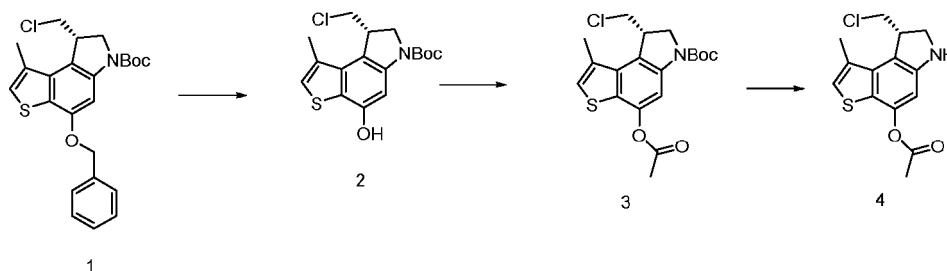
Procedimientos generales:

Procedimiento general A: A una solución en agitación del mono o diácido, en THF, diclorometano o una mezcla de ambos a 0 °C, se le añadió cloruro de oxalilo (1-2,5 equiv.) seguido de una cantidad catalítica de DMF. La reacción se dejó en agitación a 0 °C durante varios minutos antes de que se dejara calentar a temperatura ambiente, y después se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos a varias horas. Después, la reacción se concentró al vacío. En algunos casos, el material en bruto después se destiló azeotrópicamente de una a varias veces con heptano, u otro disolvente o disolventes adecuados. Después, el material en bruto se secó a alto vacío antes de que se usara en la siguiente etapa.

Procedimiento general B: A una solución en agitación de la amina (2-2,5 equiv.) en THF, diclorometano o una mezcla de ambos a 0 °C (o en algunos casos otro disolvente o disolventes adecuados), se le añadió el cloruro de ácido, o dicloruro de ácido, seguido de piridina (3-6 equiv.), trietilamina (3-6 equiv.) u otra base adecuada (3-6 equiv.). La reacción se dejó en agitación a 0 °C durante unos segundos a varios minutos antes de que se dejara calentar a temperatura ambiente, y después se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos a varias horas. Después, la reacción se concentró al vacío. En algunos casos, el material en bruto después se destiló azeotrópicamente de una a varias veces con heptano, u otro disolvente o disolventes adecuados. En la mayoría de los casos, el material en bruto se purificó después por un procedimiento descrito tal como cromatografía sobre sílice o cromatografía de fase inversa C18 a media presión.

Ejemplos:

Preparación de acetato de (S)-8-(clorometil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-4-ilo (4).

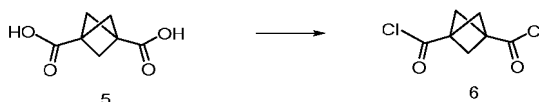


Etapla 1: Síntesis de (S)-8-(clorometil)-4-hidroxi-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indolo-6-carboxilato de *tert*-butilo (**2**). A una solución en agitación de (8S)-4-(benziloxi)-8-(clorometil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indolo-6-carboxilato de *tert*-butilo (**1**) [preparado como se describe en J. Am. Chem. Soc., 2007, 129, 14092-14099.] (100 mg, 0,225 mmol) en THF (1,5 ml) se le añadió Pd al 10 %/C (33 mg) seguido de una solución acuosa al 25 % de formiato amónico (0,15 ml). La solución se agitó durante 2 h. La solución se diluyó con éter (6 ml) y se añadió sulfato sódico. La mezcla se filtró a través de Celite y el disolvente se retiró al vacío, proporcionando el producto deseado **2** en forma de un sólido de color blanco (79 mg, 100 %).

Etapla 2: Síntesis de (S)-4-acetoxi-8-(clorometil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indolo-6-carboxilato de *tert*-butilo (**3**). Se disolvió (S)-8-(clorometil)-4-hidroxi-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indolo-6-carboxilato de *tert*-butilo (2,69 mg, 0,19 mmol) en CH₂Cl₂ (2 ml). Piridina (46 mg, 0,585 mmol). Se añadió cloruro de acetilo (16 ml, 0,234 mmol) y la reacción se agitó durante 2 h. El disolvente se retiró al vacío. El residuo en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida (EtOAc al 0-100 %/heptano) para proporcionar el producto deseado (45 mg, 58 %).

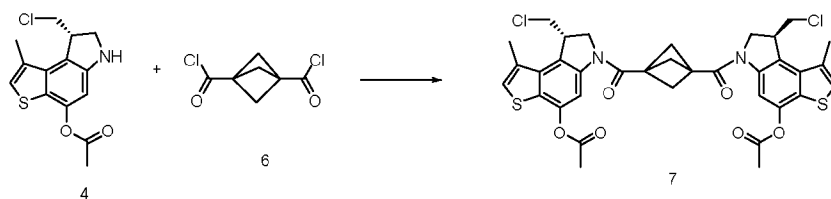
Etapla 3: Síntesis de acetato de (S)-8-(clorometil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-4-ilo (**4**): Se recogió (S)-4-acetoxi-8-(clorometil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indolo-6-carboxilato de *tert*-butilo (**3**) (45 mg, 0,11 mmol) en dioxano (1 ml). Se añadió HCl 4 N en dioxano (1 ml) y la solución se agitó durante 2 h. El disolvente se retiró para proporcionar el material diana en bruto en rendimiento cuantitativo y el material se usó inmediatamente tal cual.

Preparación de cloruro del ácido biciclo[1.1.1]pentano-1,3-dicarboxílico (6)



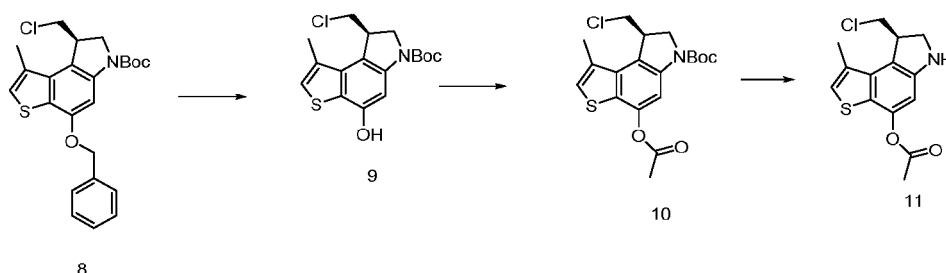
Se puso ácido biciclo[1.1.1]pentano-1,3-dicarboxílico (50 mg) en un vial, se recogió en THF (1 ml) y se añadió una gota de DMF. Se añadió lentamente dicloruro de oxalilo (122 mg, 0,961 mmol, 0,0825 ml) y la solución se burbujeó rápidamente. Después de 2 h, el disolvente se retiró y el dicloruro de ácido **6** se usó tal cual en reacciones posteriores.

Preparación de diacetato de (8S,8'S)-(biciclo[1.1.1]pentano-1,3-dicarbonil)bis(8-(clorometil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indolo-6,4-diilo) (7).



Etapa 1: diacetato de (8S,8'S)-(biciclo[1,1,1]pentano-1,3-dicarbonil)bis(8-(clorometil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indolo-6,4-diilo) (**7**). : El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento general B usando **4** (20,0 mg, 0,060 mmol), **6** (5,81 mg, 0,0301 mmol, 0,0301 ml, 1 M en THF), piridina (14,3 0,181 mmol) y THF (1,0 ml), y la purificación usando el Material se purificó por cromatografía C18 de fase inversa a media presión (Gradiente: acetonitrilo del 0 % al 80 % en agua con TFA al 0,02 % en cada fase) (proporcionando el producto deseado **7**. (8,0 mg, 20 %). CL-EM (Protocolo B): m/z 711,3 [M+H]⁺, tiempo de retención = 1,12 minutos

Preparación de acetato de (R)-8-(clorometil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-4-ilo (**11**).

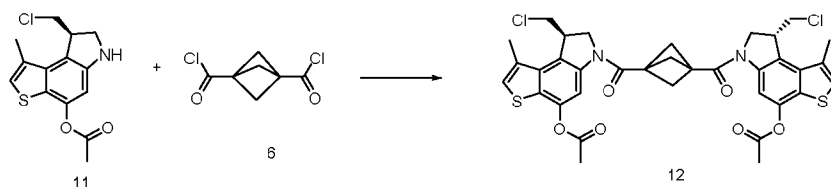


Etapa 1: Síntesis de (R)-8-(clorometil)-4-hidroxi-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indolo-6-carboxilato de *tert*-butilo (**9**). A una solución en agitación de (8R)-4-(benciloxi)-8-(clorometil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indolo-6-carboxilato de *tert*-butilo (**8**) [preparado como se describe en J. Am. Chem. Soc., 2007, 129, 14092-14099.] (100 mg, 0,225 mmol) en THF (1,5 ml) se le añadió Pd al 10 %/C (33 mg) seguido de una solución acuosa al 25 % de formiato amónico (0,15 ml). La solución se agitó durante 2 h. La solución se diluyó con éter (6 ml) y se añadió sulfato sódico. La mezcla se filtró a través de Celite y el disolvente se retiró al vacío, proporcionando el producto deseado **9** en forma de un sólido de color blanco (79 mg, 100 %).

Etapa 2: Síntesis de (R)-4-acetoxi-8-(clorometil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indolo-6-carboxilato de *tert*-butilo (**10**): Se disolvió (R)-8-(clorometil)-4-hidroxi-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indolo-6-carboxilato de *tert*-butilo (**9**) (69 mg, 0,19 mmol) en CH₂Cl₂ (2 ml). Se añadió piridina (46 mg, 0,585 mmol). Se añadió cloruro de acetilo (16 ml, 0,234 mmol) y la reacción se agitó durante 2 h. El disolvente se retiró al vacío. El residuo en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida (EtOAc al 0-100 %/heptano) para proporcionar el producto deseado **10** (53 mg, 69 %).

Etapa 3: Síntesis de acetato de (R)-8-(clorometil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-4-ilo (**11**): Se recogió (R)-4-acetoxi-8-(clorometil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indolo-6-carboxilato de *tert*-butilo (**10**) (53 mg, 0,13 mmol) en dioxano (1 ml). Se añadió HCl 4 N en dioxano (1 ml) y la solución se agitó durante 2 h. El disolvente se retiró para proporcionar el material diano en bruto con rendimiento cuantitativo y el material se usó inmediatamente tal cual en la preparación de diacetato de (8R,8'R)-(biciclo[1.1.1]pentano-1,3-dicarbonil)bis(8-(clorometil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indolo-6,4-diilo) (**12**).

Preparación de diacetato de (8R,8'R)-(biciclo[1.1.1]pentano-1,3-dicarbonil)bis(8-(clorometil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indolo-6,4-diilo) (**12**)

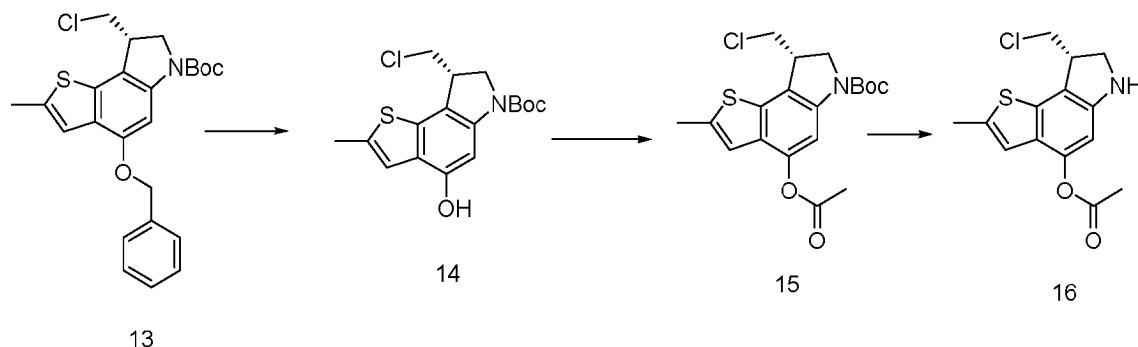


Etapa 1: Síntesis de diacetato de (8R,8'R)-(biciclo[1.1.1]pentano-1,3-dicarbonil)bis(8-(clorometil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indolo-6,4-diilo) (**12**).

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento general B usando **11** (20,0 mg, 0,060 mmol) y **6** (5,81 mg, 0,0301 mmol, 0,0301 ml, 1 M en THF), piridina (14,3 0,181 mmol) y THF (1,0 ml) y se purificó usando cromatografía de fase inversa C18 a media presión (Gradiente: acetonitrilo del 0 % al 80 % en agua con TFA al 0,02 % en cada fase), proporcionando el producto deseado **12**. (5,9 mg, 14 %). CL-EM (Protocolo B): m/z 711,2 [M+H]⁺, tiempo de retención

= 1,12 minutos

Preparación de acetato de (S)-8-(clorometil)-2-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[2,3-e]indol-4-ilo (16):

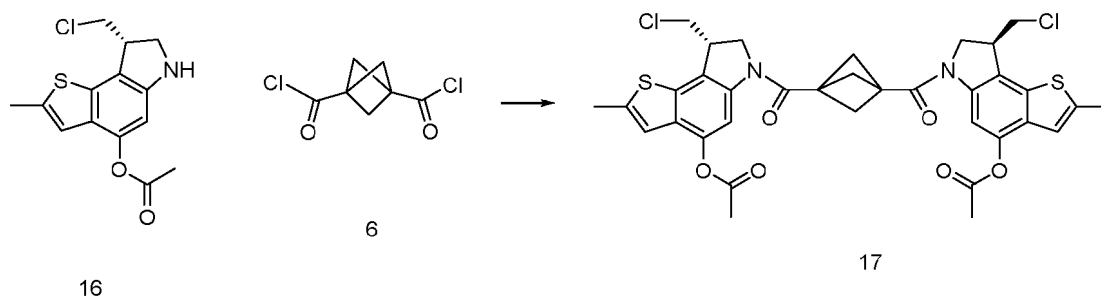


Etapa 1: Síntesis de (S)-8-(clorometil)-4-hidroxi-2-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[2,3-e]indol-6-carboxilato de *terc*-butilo (**14**): (S)-4-(benciloxi)-8-(clorometil)-2-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[2,3-e]indol-6-carboxilato de *terc*-butilo (**13**) [preparado como se describe en J. Am. Chem. Soc., 2007, 129, 14092-14099.] (250 mg, 0,563 mmol) se recogió en THF (5,63 ml). Se añadió Pd al 10 %/C (80 mg). Se añadió una sal de amonio del ácido fórmico acuosa al 25 % recién preparada (500 mg, 2 mmol, 0,5 ml) y la reacción se agitó durante 30 min. La mezcla de reacción se diluyó con éter (15 ml) y se añadió Na₂SO₄. La solución se filtró a través de Celite y el disolvente se retiró al vacío para proporcionar el compuesto del título **14** (191 mg, 95 %)

Etapa 2: Síntesis de (S)-4-acetoxi-8-(clorometil)-2-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[2,3-e]indol-6-carboxilato de *terc*-butilo (**15**): Se disolvió (S)-8-(clorometil)-4-hidroxi-2-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[2,3-e]indol-6-carboxilato de *terc*-butilo (**14**, 171 mg, 0,483 mmol) en CH₂Cl₂ (5,0 ml). Se añadió piridina (213 mg, 2,69 mmol) seguido de cloruro de acetilo (114 mg, 1,45 mmol). La reacción se agitó durante una noche y la solución se volvió de color naranja/pardo. El disolvente se retiró al vacío, dejando un sólido en bruto de color naranja. El residuo en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida (EtOAc al 0-100 %/heptano) para proporcionar, después de la retirada del disolvente, el producto deseado **15** (171,0 mg, 89,4 %)

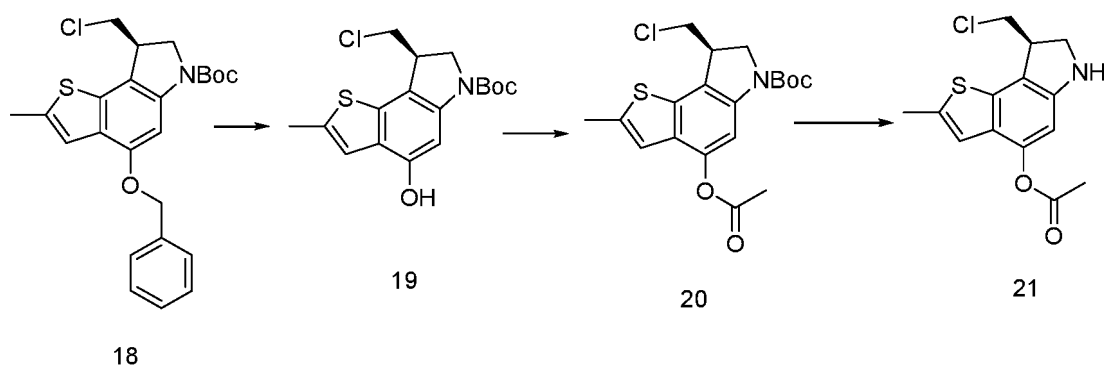
Etapa 3: Síntesis de acetato de (S)-8-(clorometil)-2-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[2,3-e]indol-4-ilo (**16**): Se recogió (S)-4-acetoxi-8-(clorometil)-2-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[2,3-e]indol-6-carboxilato de *terc*-butilo (**15**, 20 mg, 0,051 mmol) en HCl 4 N en dioxano (1 ml). La reacción se dejó en reposo durante una noche y el disolvente se retiró para proporcionar el material diana en bruto **16** con rendimiento cuantitativo y el material se usó inmediatamente

Preparación de diacetato de biciclo[1.1.1]pentano-1,3-diilbis[carbonil(8S)-8-(clorometil)-2-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[2,3-e]indol-6,4-diilo] (17)



Etapa 1: Síntesis de diacetato de biciclo[1.1.1]pentano-1,3-diilbis[carbonil(8S)-8-(clorometil)-2-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[2,3-e]indol-6,4-diilo] (**17**): El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento general B usando **16**, (17 mg, 0,051) y **6** (4,94 mg, 0,026 mmol, 0,0301 ml, 1 M en THF), piridina (14,3 0,181 mmol) y THF (1,0 ml) y se purificó usando cromatografía de fase inversa C18 a media presión (Gradiente: acetonitrilo del 0 % al 80 % en agua con TFA al 0,02 % en cada fase), proporcionando el producto deseado **17** (10,0 mg, 27 %) CL-EM (Protocolo B): *m/z* 711,1 [M+H]⁺, tiempo de retención = 1,12 minutos

Preparación de acetato de (R)-8-(clorometil)-2-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[2,3-e]indol-4-ilo (21)

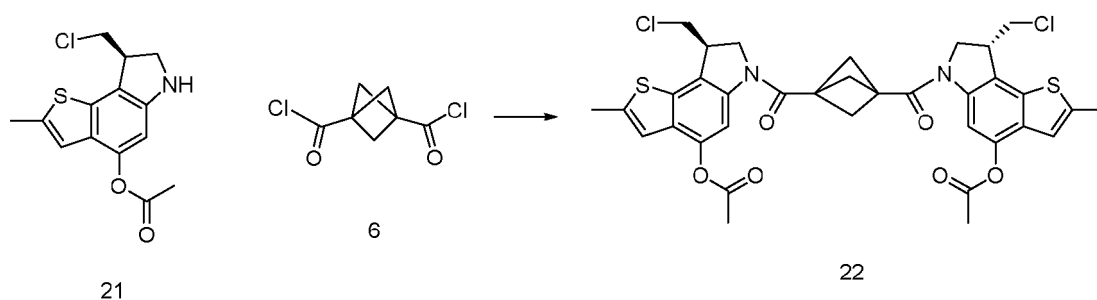


Etapa 1: Síntesis de (R)-8-(clorometil)-4-hidroxi-2-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[2,3-e]indolo-6-carboxilato de *tert*-butilo (**19**): (R)-4-(benciloxi)-8-(clorometil)-2-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[2,3-e]indolo-6-carboxilato de *tert*-butilo (**18**) [preparado como se describe en J. Am. Chem. Soc., 2007, 129, 14092-14099.] (250 mg, 0,563 mmol) se recogió en THF (5,63 ml). Se añadió Pd al 10 %/C (80 mg). Se añadió una sal de amonio del ácido fórmico acuosa al 25 % recién preparada (500 mg, 2 mmol, 0,5 ml) y la reacción se agitó durante 30 min. La mezcla de reacción se diluyó con éter (15 ml) y se añadió Na₂SO₄. La solución se filtró a través de Celite y el disolvente se retiró al vacío, dejando un sólido de color blanco de **19** en bruto (156 mg, 78 %)

Etapa 2: Síntesis de (R)-4-acetoxi-8-(clorometil)-2-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[2,3-e]indolo-6-carboxilato de *tert*-butilo (**20**): Se disolvió (R)-8-(clorometil)-4-hidroxi-2-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[2,3-e]indolo-6-carboxilato de *tert*-butilo (**19**, 136 mg, 0,384 mmol) en DCM (5,0 ml). Se añadió piridina (213 mg, 2,69 mmol) seguido de cloruro de acetilo (114 mg, 1,45 mmol). La reacción se agitó durante una noche y la solución se volvió de color naranja/pardo. El disolvente se retiró al vacío, dejando un sólido en bruto de color naranja. El residuo en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida (EtOAc al 0-100 %/heptano), proporcionando, después de la retirada del disolvente, el producto deseado **20** (113,0 mg, 74 %)

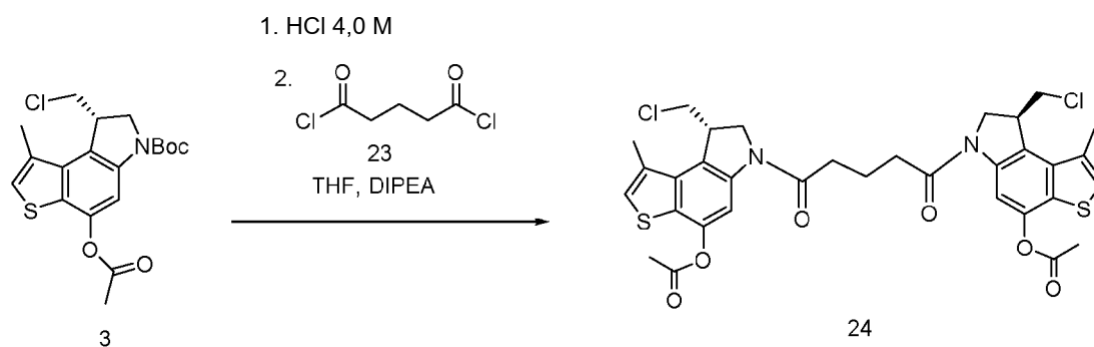
Etapa 3: Síntesis de acetato de (R)-8-(clorometil)-2-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[2,3-e]indol-4-ilo (**21**): Se recogió (R)-4-acetoxi-8-(clorometil)-2-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[2,3-e]indolo-6-carboxilato de *tert*-butilo (**20**, 25 mg, 0,051 mmol) en HCl 4 N en dioxano (1 ml). La reacción se dejó en reposo durante una noche y el disolvente se retiró para proporcionar el material diana en bruto **21** con rendimiento cuantitativo y el material se usó inmediatamente

Preparación de diacetato de biciclo[1.1.1]pentano-1,3-diilbis[carbonil(8R)-8-(clorometil)-2-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[2,3-e]indolo-6,4-diilo] (**22**)



Etapa 1: Síntesis de diacetato de biciclo[1.1.1]pentano-1,3-diilbis[carbonil(8R)-8-(clorometil)-2-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[2,3-e]indolo-6,4-diilo] (**22**): El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento general B usando **21**, (17 mg, 0,051 mmol) y **6** (4,94 mg, 0,026 mmol, 0,0301 ml, 1 M en THF), piridina (14,30,181 mmol) y THF (1,0 ml) y se purificó usando cromatografía de fase inversa C18 a media presión (Gradiente: acetonitrilo del 0 % al 80 % en agua con TFA al 0,02 % en cada fase), proporcionando el producto deseado **22** (8,6 mg, 19 %) CL-EM (Protocolo B): *m/z* 711,1 [M+H]⁺, tiempo de retención = 1,12 minutos

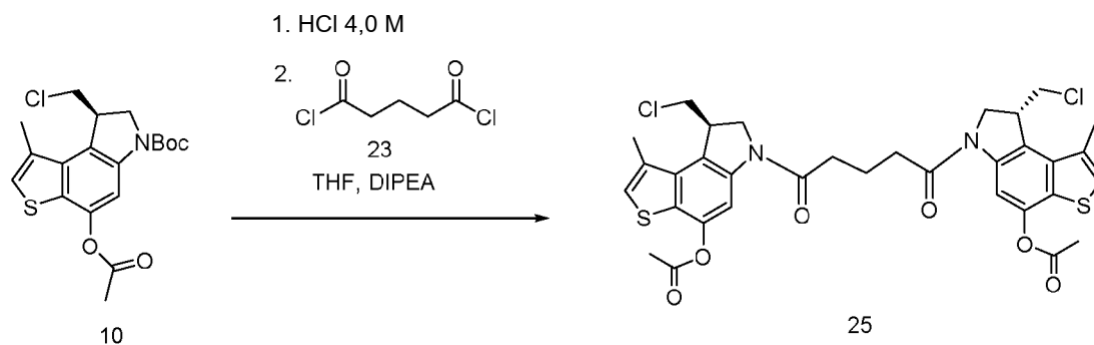
Preparación de diacetato de (8S,8'S)-glutaroilbis(8-(clorometil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indolo-6,4-diilo) (**24**)



Etapa 1: Síntesis de diacetato de (8S,8'S)-glutaroilbis(8-(clorometil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indolo-6,4-diilo) (**24**): Una solución de **3** (10 mg, 0,025 mmol) se trató con HCl 4 M (0,5 ml en dioxano) a ta durante 1 h y se concentró al vacío. El residuo se disolvió en THF (2 ml) y se añadió cloruro de glutarilo (2,13 mg, 0,0125 mmol) seguido de DIPEA (13 µl, 0,074 mmol). La mezcla resultante se agitó a ta durante 30 min. La mezcla de reacción se concentró y el residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice usando MeOH/DCM (0 -10 %) para dar el producto en forma de un sólido de color blanquecino, que se trató con MeOH y se filtró para dar el producto **24** en forma de un sólido de color blanquecino, 6 mg (70 %). CL-EM (Protocolo B): m/z 687,1 $[M+H]^+$, tiempo de retención = 1,11 minutos.

1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 8,24 (s, 2H), 7,13 (s, 2H), 4,36 (d, J = 10,5 Hz, 2H), 4,17 (m, 2H), 4,06 (m, 2H), 3,74 (d, J = 10,9 Hz, 2H), 3,39 (t, J = 10,9 Hz, 2H), 2,80 (m, 2H), 2,66 (m, 2H), 2,55 (s, 6H), 2,37 (s, 6H), 2,22 (m, 2H).

Preparación de diacetato de (8R,8'R)-glutaroilbis(8-(clorometil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indolo-6,4-diilo) (25**):**

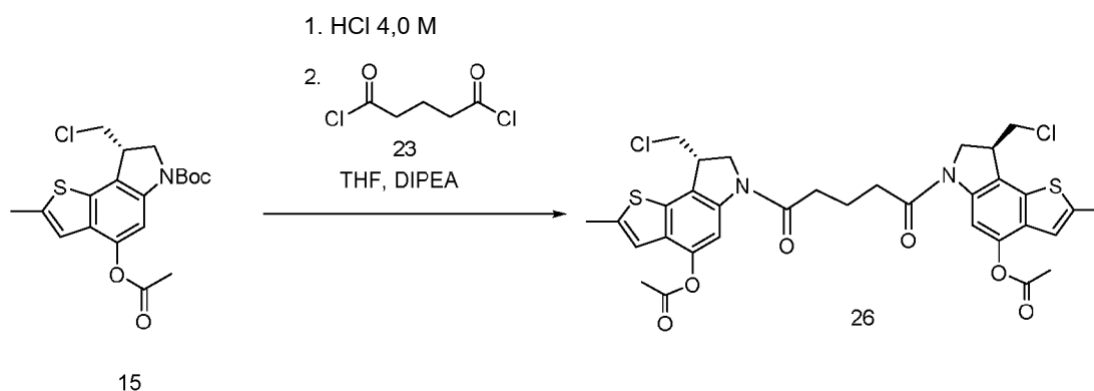


Etapa 1: Síntesis de diacetato de (8R,8'R)-glutaroilbis(8-(clorometil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indolo-6,4-diilo) (**25**):

Una solución de **10** (10 mg, 0,025 mmol) se trató con HCl 4 M (0,5 ml en dioxano) a ta durante 1 h y se concentró al vacío. El residuo se disolvió en THF (2 ml) y se añadió cloruro de glutarilo (2,13 mg, 0,0125 mmol) seguido de piridina (12 mg, 0,15 mmol). La mezcla resultante se agitó a ta durante 4 h, se concentró al vacío y el residuo se purificó por HPLC de fase inversa (Procedimiento C) para dar el producto **25** en forma de un sólido de color blanquecino, 1,5 mg (17 %). CL-EM (Protocolo B): m/z 687,1 $[M+H]^+$, tiempo de retención = 1,11

1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 8,24 (s, 2H), 7,13 (s, 2H), 4,37 (d, J = 10,5 Hz, 2H), 4,18 (m, 2H), 4,06 (m, 2H), 3,73 (d, J = 10,9 Hz, 2H), 3,39 (t, J = 10,9 Hz, 2H), 2,77 (m, 2H), 2,66 (m, 2H), 2,55 (s, 6H), 2,37 (s, 6H), 2,22 (m, 2H).

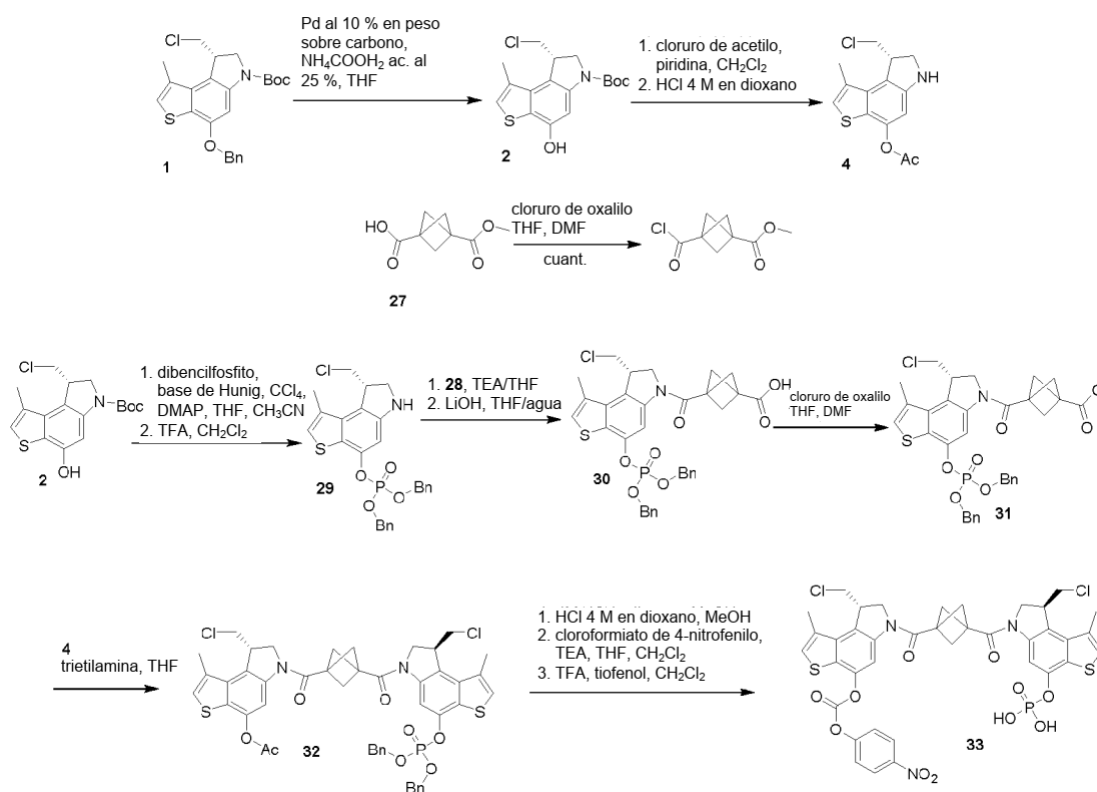
Preparación de diacetato de (8S,8'S)-glutaroilbis(8-(clorometil)-2-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[2,3-e]indolo-6,4-diilo) (26**):**



Etapa 1: diacetato de (8S,8'S)-glutaroilbis(8-(clorometil)-2-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[2,3-e]indolo-6,4-diilo) (**26**): Una solución de **15** (12 mg, 0,03 mmol) se trató con HCl 4 M (0,5 ml en dioxano) a ta durante 1 h y se concentró al vacío. El residuo se disolvió en THF (2 ml) y se añadió cloruro de glutarilo (2,5 mg, 0,015 mmol) seguido de DIPEA (16 ul, 0,09 mmol). La mezcla resultante se agitó a ta durante 30 min, se concentró al vacío y el residuo se purificó por ISCO usando MeOH/DCM (0 - 10 %) para dar el producto **26** en forma de un sólido de color blanquecino, 6 mg (60 %): CL-EM (Protocolo B): m/z 687,1 $[M+H]^+$, tiempo de retención = 1,11.

1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 8,12 (s, 2H), 6,84 (s, 2H), 4,32 (m, 2H), 4,2 (m, 2H), 4,05 (d, J = 10,9 Hz, 2H), 3,93 (m, 2H), 3,62 (m, 2H), 2,68 (s a, 4H), 2,56 (s, 6H), 2,37 (s, 6H), 2,19 (s a, 2H).

Preparación de 4-nitrofenil carbonato de (8S)-8-(clorometil)-6-[(3-[(8S)-8-(clorometil)-1-metil-4-(fosfonooxi)-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-6-il]carbonil]biciclo[1.1.1]pent-1-il]carbonil]-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-4-ilo (33**).**



Etapa 1: Síntesis de (8S)-8-(clorometil)-4-hidroxi-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indolo-6-carboxilato de *tert*-butilo (**2**). A una solución en agitación de (8S)-4-(benciloxi)-8-(clorometil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indolo-6-carboxilato de *tert*-butilo **1** [preparado como se describe en J. Am. Chem. Soc., 2007, 129, 14092-14099.] (575 mg, 1,30 mmol) en 18 ml de THF a 0 °C, se le añadió paladio al 10 % en peso sobre carbono (250 mg) seguido de la lenta adición gota a gota de 2,0 ml de formiato amónico al 25 % en agua. La reacción se dejó en agitación a 0 °C durante ~90 minutos. La reacción se diluyó con éter seguido de la adición de sulfato sódico. Los extractos orgánicos se combinaron y después se redujeron antes de ponerse al vacío, produciendo **2** (458 mg, cuantitativo) en forma de un sólido de color blanquecino. CL-EM (Protocolo A): m/z 352,2 $[M-H]$, tiempo de retención = 1,96 minutos.

Etapa 2: Síntesis de acetato de (8S)-8-(clorometil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-4-ilo (**4**). A una solución en agitación de **2** (209 mg, 0,591 mmol) en 8 ml de diclorometano a 0 °C se le añadió cloruro de acetilo (0,0462 ml, 0,650 mmol) seguido inmediatamente de piridina (0,0714 ml, 0,886 mmol). La reacción se dejó en agitación a 0 °C durante ~10 minutos. La reacción se redujo sobre sílice. Después, se realizó cromatografía sobre sílice (gradiente: acetona al 0 %- 15 % en heptanos). Los tubos de ensayo apropiados se concentraron y se pusieron a alto vacío para producir un sólido de color blanco. A este sólido de color blanco se le añadió HCl 4 M en dioxano (10 ml, 40 mmol) y la reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante ~90 minutos. La reacción se diluyó con heptano, se concentró al vacío y después se puso a alto vacío para producir **4** (170 mg, rendimiento del 80 %, 2 etapas) en forma de un sólido de color naranja claro. CL-EM (Protocolo A): m/z 296,1 $[M+H]^+$, tiempo de retención = 1,56 minutos. 1H RMN (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ 7,53 (s, 1H), 7,05 (s, 1H), 4,27-4,19 (m, 1H), 3,93-3,86 (m, 1H), 3,80-3,75 (m, 1H), 3,72-3,64 (m, 2H), 2,54 (s, 3H), 2,37 (s, 3H).

Etapa 3: Síntesis de 3-(clorocarbonil)biciclo[1,1,1]pentano-1-carboxilato de metilo (**28**). Siguiendo el procedimiento general A y usando ácido 3-(metoxicarbonil)biciclo[1,1,1]pentano-1-carboxílico **27** (86,8 mg, 0,510 mmol), cloruro

de oxalilo (0,0525 ml, 0,612 mmol), THF (6 ml) y 1 gota de DMF, se preparó **28** en forma de un sólido de color blanco (97 mg, cuant.). El producto **28** en bruto se usó tal cual sin purificación adicional.

Etapas 4: Síntesis de (8S)-8-(clorometil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-4-il fosfato de dibencilo (**29**). A una solución en agitación de **2** (4,5 g, 13,4 mmol) en 8 ml de THF y 8 ml de acetonitrilo se le añadió tetracloruro de carbono (0,997 ml, 10,3 mmol) seguido de base de Hunig (0,512 ml, 2,94 mmol), dibencilfosfito (0,974 ml, 4,41 mmol) y DMAP (18 mg, 0,147 mmol). La reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante ~10 minutos. La reacción se redujo sobre sílice. Después, se realizó cromatografía sobre sílice (gradiente: acetona al 0 %-25 % en heptanos). Los tubos de ensayo apropiados se concentraron y se pusieron a alto vacío para producir un sólido de color blanco. El material en bruto se disolvió en 5 ml de diclorometano seguido de la adición de ácido trifluoroacético (5 ml, 70 mmol). La reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 60 segundos, se concentró inmediatamente al vacío, y después se puso a alto vacío, proporcionando **29** (321 mg, rendimiento del 70 %, 2 etapas) en forma de una mezcla transparente de aceite y sólido de color blanco. CL-EM (Protocolo A): m/z 514,1 [M+H]⁺, tiempo de retención = 2,14 minutos.

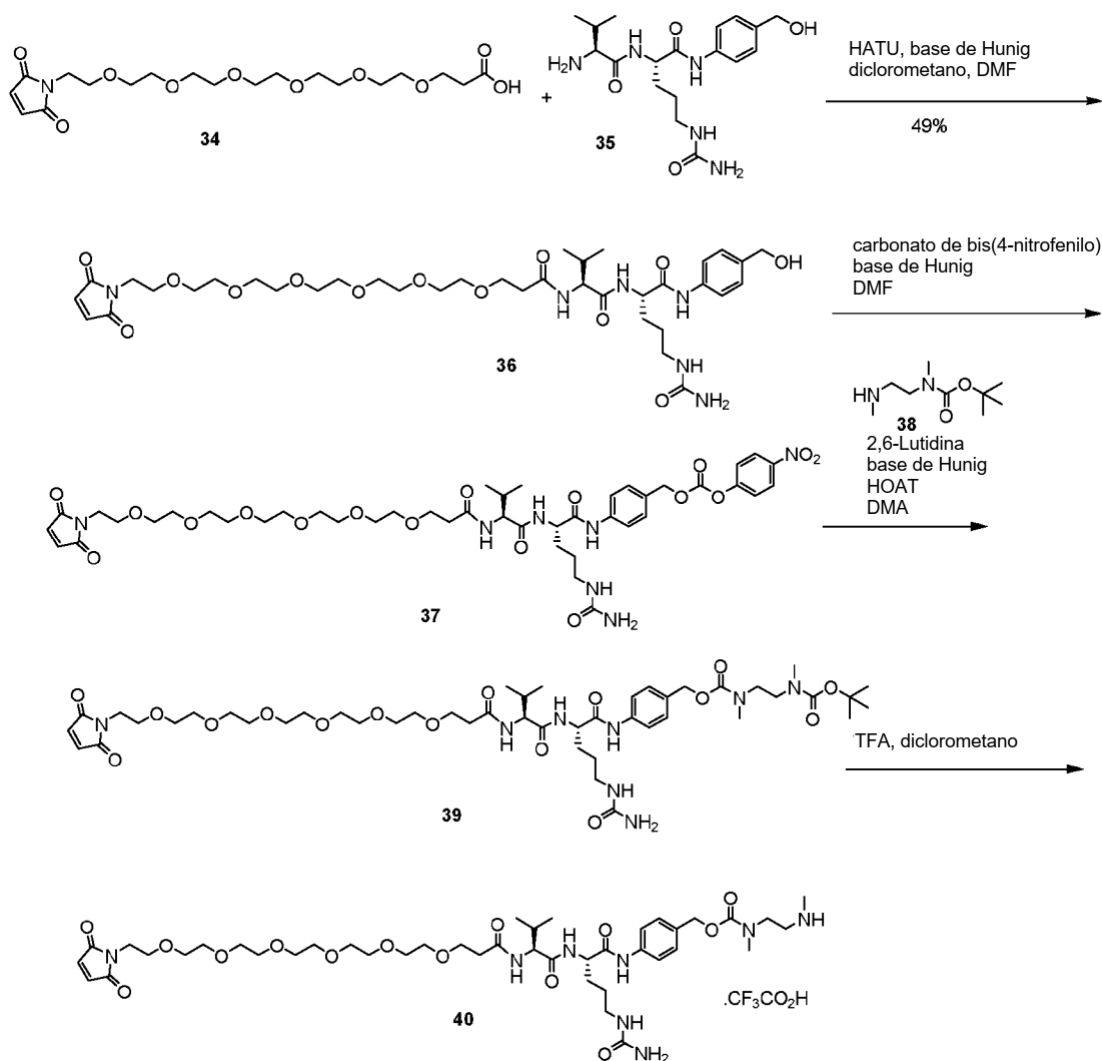
Etapas 5: Síntesis de ácido 3-[[[(8S)-4-[[bis(benciloxi)fosforil]oxi]-8-(clorometil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-6-il]carbonil]biciclo[1.1.1]pentano-1-carboxílico (**30**). Siguiendo el procedimiento general B y usando **29** (315 mg, 0,502 mmol), **28** (94,6 mg, 0,502 mmol), trietilamina (0,210 ml, 1,50 mmol) y THF (20 ml) y purificación usando cromatografía sobre gel de sílice (Gradiente: acetona del 0 % al 35 % en heptano). Los tubos de ensayo apropiados se combinaron y se concentraron al vacío, produciendo un sólido de color blanco. El material se disolvió en THF (10 ml) seguido de la adición de hidróxido de litio disuelto en 2,5 ml de agua. La reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante ~45 minutos. La reacción se diluyó con diclorometano y se interrumpió a través de la adición de HCl 1 N (ac.). La reacción se transfirió a un embudo de decantación. La fase orgánica se separó y la fase acuosa se lavó dos veces con diclorometano. Las fases orgánicas se combinaron, se lavaron una vez con salmuera, se lavaron una vez con agua, se secaron sobre sulfato sódico, se filtraron, se concentraron al vacío y después se pusieron a alto vacío, produciendo **30** (178 mg, rendimiento del 57 %, 2 etapas). CL-EM (Protocolo A): m/z 652,2 [M+H]⁺, tiempo de retención = 1,97 minutos.

Etapas 6: Síntesis de (8S)-6-[[3-[(8S)-4-[[bis(benciloxi)fosforil]oxi]-8-(clorometil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-4-il fosfato de dibencilo (**31**). Siguiendo el procedimiento general A y usando **30** (174 mg, 0,267 mmol), cloruro de oxalilo (0,0298 ml, 0,347 mmol), THF (5 ml), diclorometano (1 ml) y 1 gota de DMF, se preparó **31** en forma de un sólido de color blanco (182 mg, cuant.). El producto **31** en bruto se usó tal cual sin purificación adicional.

Etapas 7: Síntesis de acetato de (8S)-6-[[3-[[[(8S)-4-[[bis(benciloxi)fosforil]oxi]-8-(clorometil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-6-il]carbonil]biciclo[1.1.1]pent-1-il]carbonil]-8-(clorometil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-4-il]o (**32**). Siguiendo el procedimiento general B y usando **31** (167 mg, 0,249 mmol), **4** (99,3 mg, 0,299 mmol), trietilamina (0,104 ml, 0,747 mmol) y THF (20 ml) y purificación usando cromatografía sobre gel de sílice (Gradiente: acetona del 0 % al 50 % en heptano). Los tubos de ensayo apropiados se combinaron y se concentraron al vacío, produciendo **32** (103 mg, 45 %) en forma de un sólido de color blanco. CL-EM (Protocolo A): m/z 929,3 [M+H]⁺, tiempo de retención = 2,44 minutos. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆): δ 8,37 (s, 1H), 8,09 (s, 1H), 7,54-7,50 (m, 2H), 7,39-7,33 (m, 10H), 5,23-5,14 (m, 4H), 4,53-4,46 (m, 2H), 4,38-4,25 (m, 4H), 4,02-3,95 (m, 2H), 3,78-3,69 (m, 2H), 2,63 (s, 6H), 2,57-2,53 (m, 6H), 2,39 (s, 3H).

Etapas 8: Síntesis de 4-nitrofenil carbonato de (8S)-8-(clorometil)-6-[[3-[[[(8S)-8-(clorometil)-1-metil-4-(fosfonooxi)-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-6-il]carbonil]biciclo[1.1.1]pent-1-il]carbonil]-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-4-il] (**33**). A una solución en agitación de **32** (99 mg, 0,11 mmol) en 6 ml de metanol, se le añadió HCl 4 M en dioxano (6,0 ml, 20 mmol). La reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante ~15 minutos. La reacción se redujo y después se puso a alto vacío. A una solución en agitación del material en bruto en 6 ml de diclorometano y 6 ml de THF a 0 °C se le añadió cloroformiato de p-nitrofenilo (38,6 mg, 0,192 mmol) seguido inmediatamente de trietilamina (0,0742 ml, 0,532 mmol). La reacción se dejó en agitación a 0 °C durante ~5 minutos y después se dejó calentar a temperatura ambiente mientras se agitaba. La reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante ~10 minutos. La reacción se redujo. A una solución en agitación del material en bruto en 3 ml de diclorometano se le añadió una solución de TFA (3,0 ml, 39 mmol) en 3 ml de diclorometano seguido de la adición de tiofenol (0,109 ml, 1,06 mmol). La reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante ~6 horas. La reacción se redujo. El material en bruto se diluyó con unos mililitros de DMSO y después se inyectó en una precolumna C18 de 25 g (que se había equilibrado previamente con acetonitrilo y después con agua, con TFA al 0,02 % en cada fase). El material se purificó por cromatografía de fase inversa C18 a media presión (Gradiente: acetonitrilo del 20 % al 65 % en agua con TFA al 0,02 % en cada fase) concentrando los tubos de ensayo apropiados usando un genevac, produciendo **33** (37 mg, 40 %, 3 etapas) en forma de un sólido de color blanco. CL-EM (Protocolo A): m/z 872,3 [M+H]⁺, tiempo de retención = 1,86 minutos. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆): δ 8,44 (s, 1H), 8,40-8,33 (m, 3H), 7,78-7,72 (m, 2H), 7,59 (m, 1H), 7,47 (m, 1H), 4,53-4,44 (m, 2H), 4,38-4,22 (m, 4H), 4,04-3,94 (m, 2H), 3,81-3,75 (m, 1H), 3,72-3,65 (m, 1H), 2,62 (s, 6H), 2,58 (s, 3H), 2,54 (s, 3H).

Preparación de N-[1-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-21-oxo-3,6,9,12,15,18-hexaoxahenicosan-21-il]-L-valil-N-5~carbamoil-N-{4-[[[metil[2-(metilamino)etil]carbamoil]oxi]metil]fenil]-L-ornitina (40).



Etapa 1: Síntesis de N-[1-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-21-oxo-3,6,9,12,15,18-hexaoxahenicosan-21-il]-L-valil-N~5~-carbamoil-N-[4-(hidroximetil)fenil]-L-ornitinamida (**36**). A un matraz de fondo redondo que contenía ácido 1-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-3,6,9,12,15,18-hexaoxahenicosan-21-oico se le añadieron **34** (628 mg, 1,45 mmol), 20 ml de diclorometano, 2 ml de DMF, HATU (501 mg, 1,32 mmol) y base de Hunig (0,92 ml, 5,3 mmol). La reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 2 minutos antes de la adición de L-valil-N~5~-carbamoil-N-[4-(hidroximetil)fenil]-L-ornitinamida, **35** (500 mg, 1,32 mmol). La reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante ~90 minutos antes de que se interrumpiera mediante la adición de TFA. La reacción se concentró a un volumen menor, se diluyó con unos ml de DMSO y después se inyectó en una precolumna C18 de 25 g (que se había equilibrado previamente con acetonitrilo y después con agua, con TFA al 0,02 % en cada fase). El material se purificó por cromatografía de fase inversa C18 a media presión (Gradiente: acetonitrilo del 5 % al 40 % en agua con TFA al 0,02 % en cada fase) concentrando los tubos de ensayo apropiados usando un genevac, produciendo **36** (514 mg, 49 %) en forma de un sólido transparente. CL-EM (Protocolo A): m/z 795,5 $[M+H]^+$, tiempo de retención = 1,01 minutos.

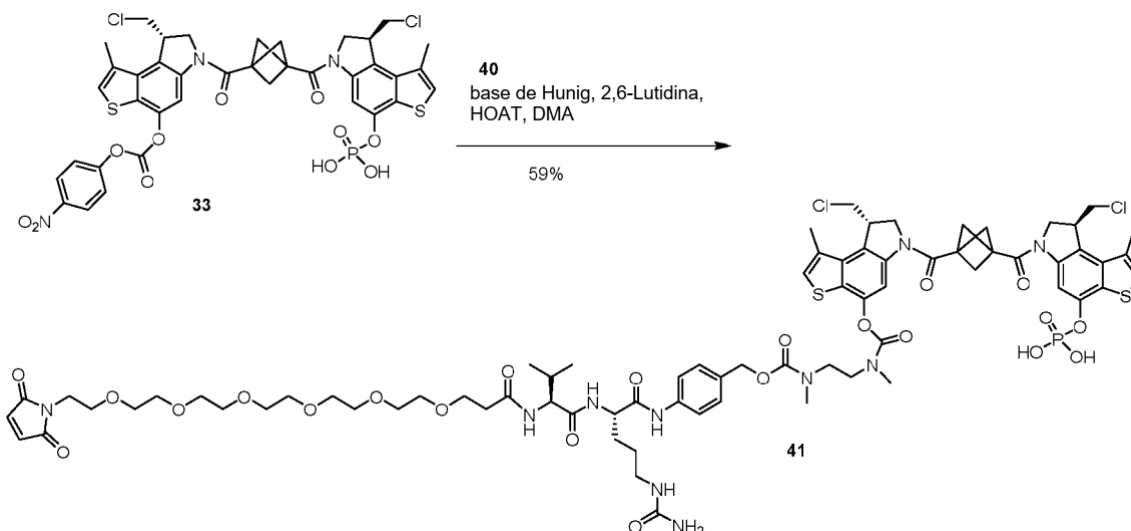
Etapa 2: Síntesis de N-[1-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-21-oxo-3,6,9,12,15,18-hexaoxahenicosan-21-il]-L-valil-N~5~-carbamoil-N-[4-((4-nitrofenoxi)carbonil)oxi]metil]fenil]-L-ornitinamida (**37**). A una solución en agitación de **36** (210 mg, 0,264 mmol) y carbonato de bis(4-nitrofenilo) (161 mg, 0,528 mmol) en 4 ml de DMF se le añadió base de Hunig (0,096 ml, 0,554 mmol). La reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante ~2 horas. La reacción se inyectó en una precolumna C18 de 25 g (que se había equilibrado previamente con acetonitrilo y después con agua, con TFA al 0,02 % en cada fase). El material se purificó por cromatografía de fase inversa C18 a media presión (Gradiente: acetonitrilo del 5 % al 55 % en agua con TFA al 0,02 % en cada fase) concentrando los tubos de ensayo apropiados usando un genevac, produciendo **37** (180 mg, 71 %) en forma de un sólido. CL-EM (Protocolo A): m/z 960,5 $[M+H]^+$, tiempo de retención = 1,48 minutos.

Etapa 3: Síntesis de N-[1-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-21-oxo-3,6,9,12,15,18-hexaoxahenicosan-21-il]-L-valil-N~5~-carbamoil-N-[4-(4,7,10,10-tetrametil-3,8-dioxo-2,9-dioxo-4,7-diazaundec-1-il)fenil]-L-ornitinamida (**39**). A una solución en agitación de **37** (640 mg, 0,667 mmol) y **38** [preparado como se describe en J. Med. Chem.

1992, 33, 559-567] (127 mg, 0,674 mmol) en 6 ml de DMA se le añadió 2,6-Lutidina (0,154 ml, 1,33 mmol) seguido de base de Hunig (0,232 ml, 1,33 mmol) y HOAT (9,1 mg, 0,67 mmol). La reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante ~15 minutos. La reacción se inyectó en una precolumna C18 de 25 g (que se había equilibrado previamente con acetonitrilo y después con agua, con TFA al 0,02 % en cada fase). El material se purificó por cromatografía de fase inversa C18 a media presión (Gradiente: acetonitrilo del 5 % al 40 % en agua con TFA al 0,02 % en cada fase) concentrando los tubos de ensayo apropiados usando un genevac, produciendo **39** (564 mg, 84 %) en forma de un sólido de tipo cera de color blanco. CL-EM (Protocolo A): m/z 1009,7 $[M+H]^+$, tiempo de retención = 1,43 minutos.

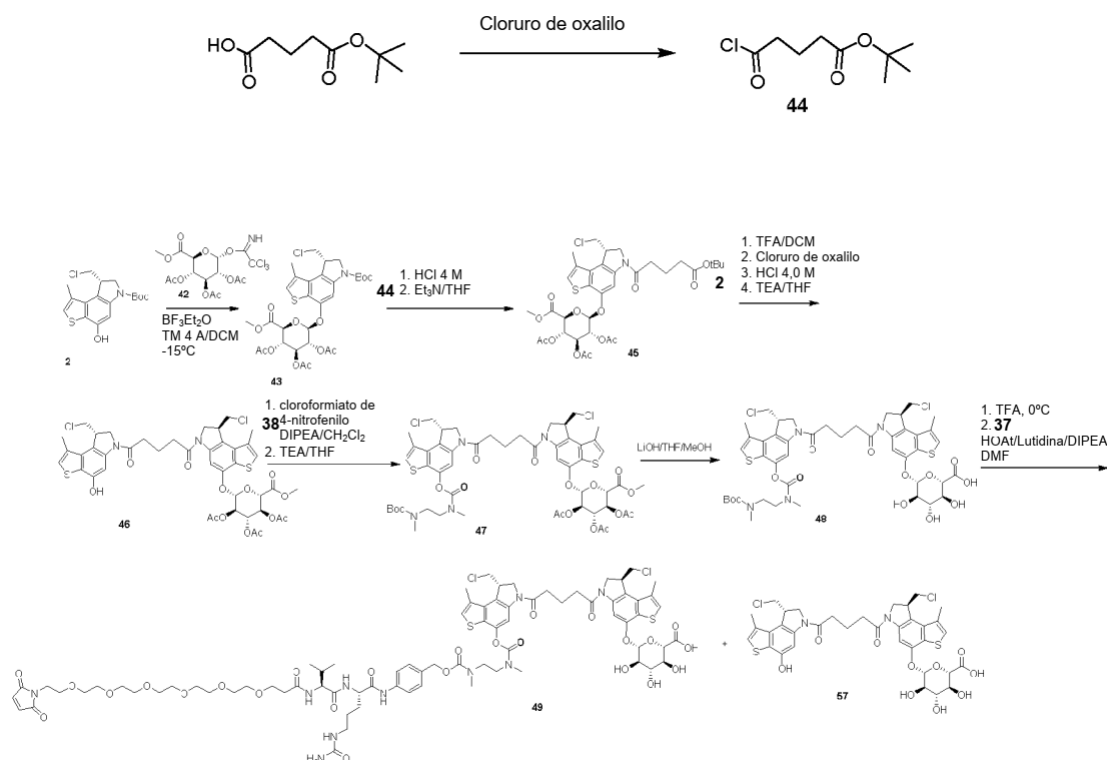
Etapla 4: Síntesis de N-[1-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-21-oxo-3,6,9,12,15,18-hexaoxahenicosan-21-il]-L-valil-N~5~-carbamoil-N-{4-[[{(2-[[{(8S)-8-(clorometil)-6-[[3-[[{(8S)-8-(clorometil)-1-metil-4-(fosfonooxi)-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-6-il]carbonil]biciclo[1.1.1]pent-1-il]carbonil]-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-4-il]oxi)carbonil](metil)amino}etil)(metil)carbamoil]oxi}metil]fenil]-L-ornitinamida (**40**). A una mezcla en agitación de **39** (470 mg, 0,466 mmol) en 6 ml de diclorometano se le añadió TFA (3,0 ml, 40 mmol). La reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante ~10 minutos. La reacción se redujo. El residuo se purificó por cromatografía de fase inversa C18 a media presión (Gradiente: acetonitrilo del 5 % al 30 % en agua con TFA al 0,02 % en cada fase) concentrando los tubos de ensayo apropiados usando un genevac, produciendo **40** (326 mg, 68 %) en forma de una mezcla de aceite/sólido de color blanco. CL-EM (Protocolo A): m/z 909,8 $[M+H]^+$, tiempo de retención = 0,91 minutos.

Preparación de N-[1-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-21-oxo-3,6,9,12,15,18-hexaoxahenicosan-21-il]-L-valil-N~5~-carbamoil-N-{4-[[{(2-[[{(8S)-8-(clorometil)-6-[[3-[[{(8S)-8-(clorometil)-1-metil-4-(fosfonooxi)-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-6-il]carbonil]biciclo[1.1.1]pent-1-il]carbonil]-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-4-il]oxi)carbonil](metil)amino}etil)(metil)carbamoil]oxi}metil]fenil]-L-ornitinamida (41**).**



Etapla 1: Síntesis de N-[1-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-21-oxo-3,6,9,12,15,18-hexaoxahenicosan-21-il]-L-valil-N~5~-carbamoil-N-{4-[[{(2-[[{(8S)-8-(clorometil)-6-[[3-[[{(8S)-8-(clorometil)-1-metil-4-(fosfonooxi)-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-6-il]carbonil]biciclo[1.1.1]pent-1-il]carbonil]-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-4-il]oxi)carbonil](metil)amino}etil)(metil)carbamoil]oxi}metil]fenil]-L-ornitinamida (**41**). A un vial de 2 dram que contenía **33** (8,0 mg, 0,0092 mmol) y **40** (10,3 mg, 0,0101 mmol) se le añadió 1,0 ml de DMA seguido de base de Hunig (0,00639 ml, 0,0367 mmol), 2,6-Lutidina (0,00425 ml, 0,0367 mmol) y HOAT (1,25 mg, 0,0367 mmol). La reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante ~5 minutos. La reacción en bruto se inyectó en una precolumna C18 de 4 g (que se había equilibrado previamente con acetonitrilo y después con agua, con TFA al 0,02 % en cada fase). El material se purificó por cromatografía de fase inversa C18 a media presión (Gradiente: acetonitrilo del 15 % al 50 % en agua con TFA al 0,02 % en cada fase) seguido de una segunda purificación por el procedimiento A, concentrando los tubos de ensayo apropiados usando un genevac, produciendo **41** (8,9 mg, 59 %) en forma de un sólido de color blanco. CL-EM (Protocolo A): m/z 1642,9 $[M+2H]^+$, tiempo de retención = 1,61 minutos.

Preparación de LP: ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(((S)-8-(clorometil)-6-(5-(((S)-8-(clorometil)-4-(((2-(((4-((23S,26S)-1-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-23-isopropil-21,24-dioxo-26-(3-ureidopropil)-3,6,9,12,15,18-hexaoxa-22,25-diazaheptacosan-27-amido)encil)oxi)carbonil)(metil)amino}etil)(metil)carbamoil]oxi)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-6-il)-5-oxopentanoil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-4-il]oxi)-3,4,5-trihidroxitetrahydro-2H-piran-2-carboxílico (**49**)



Etap 1: Síntesis de 5-cloro-5-oxopentanoato de *tert*-butilo (**44**): A una solución de ácido 5-(*tert*-butoxi)-5-oxopentanoico (110 mg, 0,58 mmol) en THF (3 ml) se le añadió cloruro de oxalilo (0,58 ml, 1,2 mmol, 2 M en DCM) a 0°C , seguido de 1 gota de DMF. La mezcla se agitó a 0°C durante 30 min y se concentró al vacío para dar el cloruro de ácido **44** correspondiente en forma de un sólido de color blanco.

Etap 2. Síntesis de triacetato de (2S,3R,4S,5S,6S)-2-(((S)-6-(*tert*-butoxicarbonil)-8-(clorometil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-4-il)oxi)-6-(metoxicarbonil)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo (**43**)

A una solución de **2** (226 mg, 0,64 mmol) en DCM (23 ml) se le añadieron tamices moleculares de 4 A (1,17 g, en polvo, <5 micrómetros, activados) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. A la mezcla de reacción se le añadió 1-2,2,2-tricloroetanimidato de 2,3,4-triacetato del éster metílico de alfa-D-glucurónico (**42**, 367 mg, 0,77 mmol) y la mezcla se enfrió a -25°C . Se añadió lentamente una solución de $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (0,13 ml, 0,32 mmol) en DCM (10 ml) y la mezcla se agitó por debajo de -20°C durante 1 h. La mezcla de reacción se filtró y la solución se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice usando un gradiente de EtOAc al 0-60 % en Heptanos para dar el producto **43** en forma de un sólido de color amarillo, 261 mg (61 %). CL-EM (Protocolo B): m/z 692,1 ($M+\text{Na}$), tiempo de retención = 1,09 min. ^1H RMN (400 MHz, CLOROFORMO- d) δ = 7,29 (s, 1H), 7,13 (s, 1H), 5,40 (s a, 3H), 4,30 (d, J = 7,4 Hz, 2H), 4,06 - 3,92 (m, 2H), 3,85 - 3,73 (m, 4H), 3,69 (d, J = 10,5 Hz, 1H), 3,36 (t, J = 10,5 Hz, 1H), 2,56 (s, 3H), 2,10 (s, 6H), 2,08 (s, 3H), 1,62 (s, 9H).

Etap 2. Síntesis de triacetato de (2S,3R,4S,5S,6S)-2-(((S)-6-(5-(*tert*-butoxi)-5-oxopentanoil)-8-(clorometil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-4-il)oxi)-6-(metoxicarbonil)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo (**45**)

Una solución de **43** (261 mg, 0,39 mmol) se trató con HCl 4 M en dioxano (3 ml) durante 1 h. Se concentró al vacío, el residuo se disolvió en THF (3,0 ml) y se añadió una solución de cloruro de ácido **44** (0,58 mmol) en THF (3,0 ml) seguido de TEA (0,163 ml, 1,2 mmol). La mezcla se agitó a 0°C durante 30 min. La mezcla se concentró y el residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice usando un gradiente de EtOAc (0-70 %) en heptanos para dar el producto en forma de un sólido de color blanquecino, 224 mg (78 %). CL-EM (Protocolo B): m/z 740,2 [$M+\text{H}$] $^+$, tiempo de retención = 1,07 minutos. ^1H RMN (400 MHz, CLOROFORMO- d) δ = 8,26 (s a, 1H), 7,13 (s, 1H), 5,45 - 5,25 (m, 4H), 4,32 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 4,12 (t, J = 8,8 Hz, 1H), 4,05 (d, J = 8,6 Hz, 1H), 3,79 - 3,66 (m, 5H), 3,33 (t, J = 10,9 Hz, 1H), 2,63 (d, J = 7,0 Hz, 1H), 2,58 - 2,47 (m, 4H), 2,45 - 2,35 (m, 2H), 2,06 (m, 11H), 1,47 (s, 9H).

Etap 3. Síntesis de triacetato de (2S,3R,4S,5S,6S)-2-(((S)-8-(clorometil)-6-(5-((S)-8-(clorometil)-4-hidroxi-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-6-il)-5-oxopentanoil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-4-il)oxi)-6-(metoxicarbonil)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo (**46**)

Una solución de **45** (116 mg, 0,16 mmol) se trató con DCM (1,5 ml) y TFA (1 ml) a ta durante 1 h, se concentró al vacío, el residuo se disolvió en THF a 0°C y se añadieron cloruro de oxalilo (0,16 ml, 0,32 mmol, 2 M en DCM) y DMF (1 gota). La mezcla se agitó a 0°C durante 30 min y se concentró al vacío para dar el cloruro de ácido correspondiente.

En un vial separado, el compuesto **2** (83 mg, 0,24 mmol) se trató con HCl 4 M (2 ml) en dioxano a ta durante 1 h, se concentró al vacío, el residuo se disolvió en THF (5 ml) a 0°C y se añadió Et_3N (100 μl , 0,78 mmol), seguido

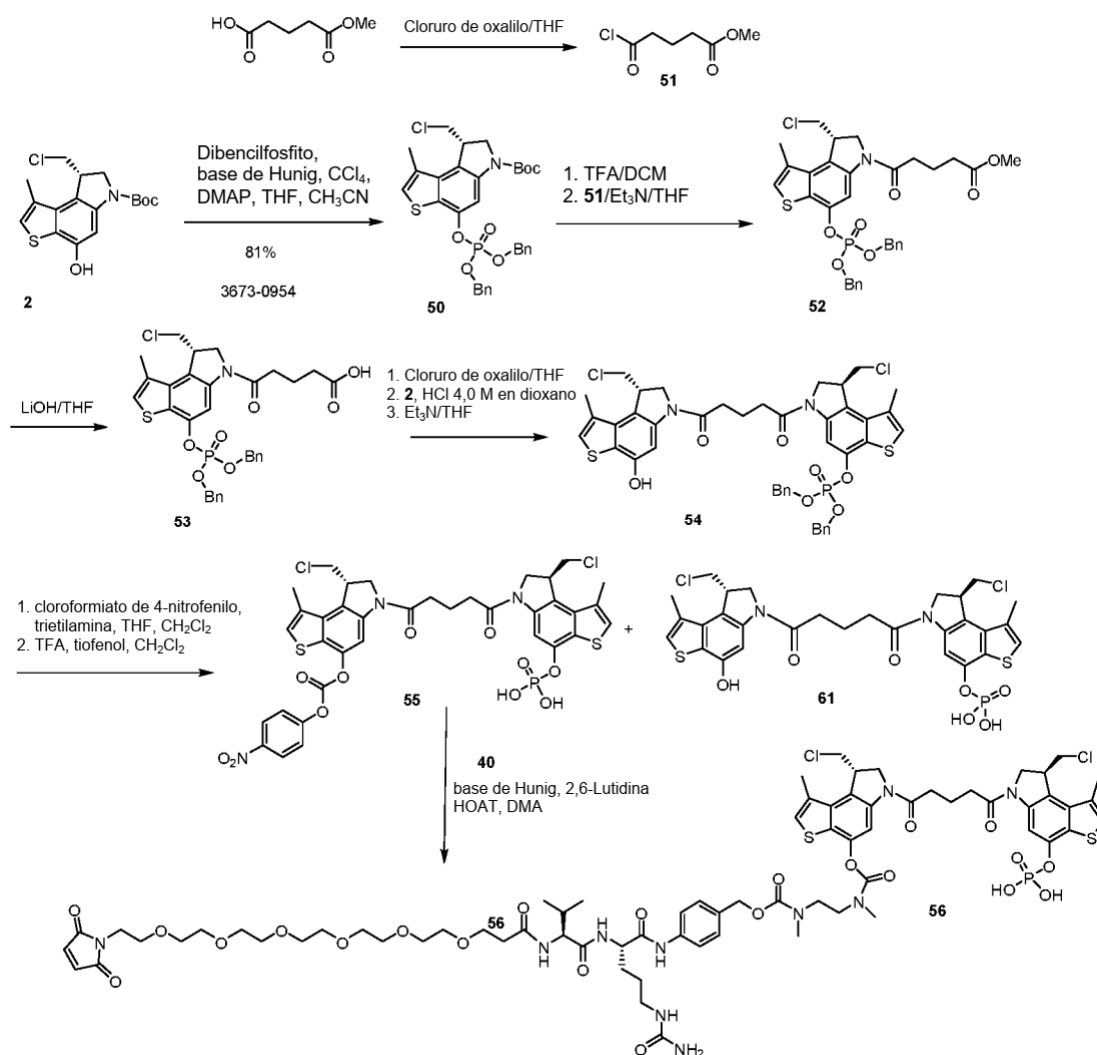
de una solución del cloruro de ácido anterior en THF (5 ml). La mezcla se agitó a 0 °C durante 20 min. La mezcla se concentró y el residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice usando un gradiente de EtOAc (0 - 100 %) en heptanos para dar el producto **46** en forma de un sólido de color blanquecino, 114 mg (79 %). CL-EM (Protocolo B): m/z 919,1 $[M+H]^+$, tiempo de retención = 1,05 minutos, 1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 10,41 (s, 1H), 8,22 (s, 1H), 7,93 (s, 1H), 7,47 (s, 1H), 7,38 (s, 1H), 5,81 - 5,70 (m, 4H), 5,63 - 5,52 (m, 1H), 5,19 (t, J = 8,6 Hz, 1H), 5,12 (t, J = 9,8 Hz, 1H), 4,76 (d, J = 9,8 Hz, 1H), 4,30 - 4,16 (m, 3H), 3,86 (m, 2H), 3,68 (s, 3H), 3,64 - 3,51 (m, 2H), 2,73 (s, 1H), 2,62 (m, 2H), 2,50 (s, 6H), 2,10-2,02 (m, 12H).

Etapa 4. Síntesis de triacetato de (2S,3R,4S,5S,6S)-2-(((S)-6-(5-((S)-4-(((2-((*tert*-butoxicarbonil)(metil)amino)etil)(metil)carbamoil)oxi)-8-(clorometil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-*e*]indol-6-il)-5-oxopentanoil)-8-(clorometil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-*e*]indol-4-il)oxi)-6-(metoxycarbonil)tetrahydro-2H-piran-3,4,5-triilo (**47**): A una solución de **46** (50 mg, 0,054 mmol) en THF (3 ml) a 0 °C se le añadió una solución de cloroformiato de 4-nitrofenilo (22 mg, 0,10 mmol) en DCM (0,5 ml), seguido de DIPEA (57 μ l, 0,33 mmol) y la mezcla se agitó a 0 °C durante 1 h. A la mezcla anterior se le añadió una solución de **38** [preparado como se describe en J. Med. Chem. 1992, 33, 559-567] (31 mg, 0,16 mmol) en THF (0,5 ml), la mezcla se agitó a 0 °C durante 30 min y se concentró al vacío y el residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice usando un gradiente de EtOAc (0 - 100 %) en heptanos para dar el producto **47** en forma de un sólido de color blanco, 56 mg (91 %). CL-EM (Protocolo B): m/z 1150,2 $[M+NH_4]^+$, tiempo de retención = 1,14 minutos

Etapa 5: Síntesis de ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(((S)-6-(5-((S)-4-(((2-((*tert*-butoxicarbonil)(metil)amino)etil)(metil)carbamoil)oxi)-8-(clorometil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-*e*]indol-6-il)-5-oxopentanoil)-8-(clorometil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-*e*]indol-4-il)oxi)-3,4,5-trihidroxitetrahydro-2H-piran-2-carboxílico (**48**): A una solución de **47** (56 mg, 0,049 mmol) en THF/MeOH (1/1, 6 ml) a 0 °C se le añadió una solución de LiOH·H₂O (21 mg, 0,49 mmol) en agua (0,5 ml). La mezcla se agitó a 0 °C durante 1 h. Se añadió ácido acético (50 mg) y la reacción se concentró al vacío para dar el producto en bruto **48** en forma de un sólido de color blanco, 45 mg (90 %). CL-EM (Protocolo B): m/z 1014,9 $[M+Na]^+$, tiempo de retención = 1,0 minutos

Etapa 6: Síntesis de ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(((S)-8-(clorometil)-6-(5-((S)-8-(clorometil)-4-(((2-(((2S,26S)-1-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-23-isopropil-21,24-dioxo-26-(3-ureidopropil)-3,6,9,12,15,18-hexaoxa-22,25-diazaheptacosan-27-amido)benzil)oxi)carbonil)(metil)amino)etil)(metil)carbamoil)oxi)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-*e*]indol-6-il)-5-oxopentanoil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-*e*]indol-4-il)oxi)-3,4,5-trihidroxitetrahydro-2H-piran-2-carboxílico (**49**) y ácido (8S)-8-(clorometil)-6-{5-[(8S)-8-(clorometil)-4-hidroxi-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-*e*]indol-6-il]-5-oxopentanoil}-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-*e*]indol-4-il)beta-D-glucopiranosidurónico (**57**): El compuesto **48** (23 mg, 0,02 mmol) se trató con TFA enfriado previamente (1 ml) a 0 °C durante 5 min y se concentró al vacío. El residuo se disolvió en DMF (2 ml), se añadieron el compuesto **37** (19 mg, 0,02 mmol), lutidina (14 μ l, 0,12 mmol), DIPEA (21 μ l, 0,12 mmol) y HOAt (2,7 mg, 0,02 mmol) y la mezcla se agitó a 30 °C durante 1 h. La mezcla se purificó por HPLC de fase inversa (Procedimiento C) para dar el compuesto **49** en forma de un sólido de color blanquecino, 8 mg (20 %). CL-EM (Protocolo B): m/z 1714,6 $[M+H]^+$, tiempo de retención = 0,89 minutos y el compuesto **57** en forma de una goma 7 mg (50 %): CL-EM (Protocolo B): m/z 779,1 $[M+H]^+$, tiempo de retención = 0,90 minutos

Preparación de: (4-((2S,26S)-1-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-23-isopropil-21,24-dioxo-26-(3-ureidopropil)-3,6,9,12,15,18-hexaoxa-22,25-diazaheptacosan-27-amido)benzil)etano-1,2-diilbis(metilcarbamoil) de (S)-8-(clorometil)-6-(5-((S)-8-(clorometil)-1-metil-4-(fosfonooxi)-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-*e*]indol-6-il)-5-oxopentanoil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-*e*]indol-4-il) (56)



Etapa 1: Síntesis de 5-cloro-5-oxopentanoato de metilo (**51**): Se disolvió ácido 5-metoxi-5-oxopentanoico (128 mg, 0,88 mmol) en THF (5 ml) a 0 °C, se añadieron cloruro de oxalilo (0,9 ml, 1,8 mmol, 2 M en DCM) y DMF (1 gota) y la mezcla se agitó a 0 °C durante 30 min. Se concentró al vacío para dar el cloruro de ácido **51** correspondiente en forma de un sólido de color blanco que se usó sin purificación adicional.

Etapa 2. Síntesis de (S)-4-((bis(benciloxi)fosforil)oxi)-8-(clorometil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indolo-6-carboxilato de *tert*-butilo (**50**)
A una solución de **2** (260 mg, 0,74 mmol) en ACN (8 ml) y THF (8 ml) se le añadieron CCl₄ (1 ml), DIPEA (0,52 ml, 2,94 mmol), difenilfosfito (1,03 ml, 4,41 mmol) y DMAP (18 mg). La mezcla se agitó a ta durante 15 min, se concentró al vacío y el residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice usando un gradiente (0-60 %) de EtOAc en heptanos para dar el producto **50** en forma de un aceite incoloro, 365 mg (81 %). CL-EM (Protocolo B): *m/z* 631,2 [M+H]⁺, tiempo de retención = 1,18 minutos

Etapa 3. Síntesis de (S)-5-(4-((bis(benciloxi)fosforil)oxi)-8-(clorometil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-6-il)-5-oxopentanoato de metilo (**52**)
A una solución de **50** (365 mg, 0,58 mmol) en DCM (3 ml) se le añadió TFA (3 ml) y la mezcla se agitó a ta durante 2 min y se concentró al vacío. El residuo se disolvió en THF (5,0 ml), se añadió una solución del cloruro de ácido **51** (0,88 mmol) en THF (5,0 ml) seguido de Et₃N (0,37 ml, 0,24 mmol) y la mezcla se agitó a 0 °C durante 30 min. La reacción se concentró y el residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice usando un gradiente (0-80 %) de EtOAc en heptanos para dar el producto **52** en forma de un aceite incoloro, 240 mg (64 %). CL-EM (Protocolo B): *m/z* 642,1 [M+H]⁺, tiempo de retención = 1,09 minutos

Etapa 4. Síntesis de ácido (S)-5-(4-((bis(benciloxi)fosforil)oxi)-8-(clorometil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-6-il)-5-oxopentanoico (**53**)
A una solución de **52** (235 mg, 0,37 mmol) en THF (10 ml) a 0 °C se le añadió una solución de LiOH/H₂O (155 mg, 3,7 mmol) en agua (2,5 ml) y la mezcla se agitó a 0 °C durante 1,5 h. La mezcla se diluyó con DCM, se acidificó

con HCl 1 M, la fase orgánica se separó y la fase acuosa se extrajo dos veces con DCM. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO₄. La mezcla se concentró al vacío y el residuo que se purificó por HPLC de fase inversa (Procedimiento C) para dar el producto **53** en forma de una espuma de color blanquecino, 27 mg (12 %). CL-EM (Protocolo B): *m/z* 628,1 [M+H]⁺, tiempo de retención = 1,01 minutos

Etapa 5. Síntesis de ((S)-8-(clorometil)-6-(5-((S)-8-(clorometil)-4-hidroxi-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-6-il)-5-oxopentanoil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-4-il)fosfato de dibencilo (**54**)

A una solución de **53** (27 mg, 0,043 mmol) en THF (5 ml) a 0 °C se le añadieron cloruro de oxalilo (0,043 ml, 0,086 mmol, 2 M en DCM) y DMF (1 gota). La mezcla se agitó a 0 °C durante 30 min y se concentró al vacío para dar el cloruro de ácido correspondiente en forma de una espuma de color amarillo.

En un vial separado, el compuesto **2** (23 mg, 0,064 mmol) se trató con HCl 4 M (1 ml) a ta durante 1 h y se concentró al vacío. El residuo se disolvió en THF (5 ml), se enfrió a 0 °C y se añadió a una solución del cloruro de ácido anterior en THF (5 ml) y Et₃N (0,018 ml, 0,13 mmol). La mezcla se concentró al vacío y el residuo se purificó por HPLC de fase inversa (Procedimiento C) para dar el producto **54** en forma de un sólido de color blanquecino, 28 mg (75 %). CL-EM (Protocolo B): *m/z* 863,2 [M+H]⁺, tiempo de retención = 1,16 minutos

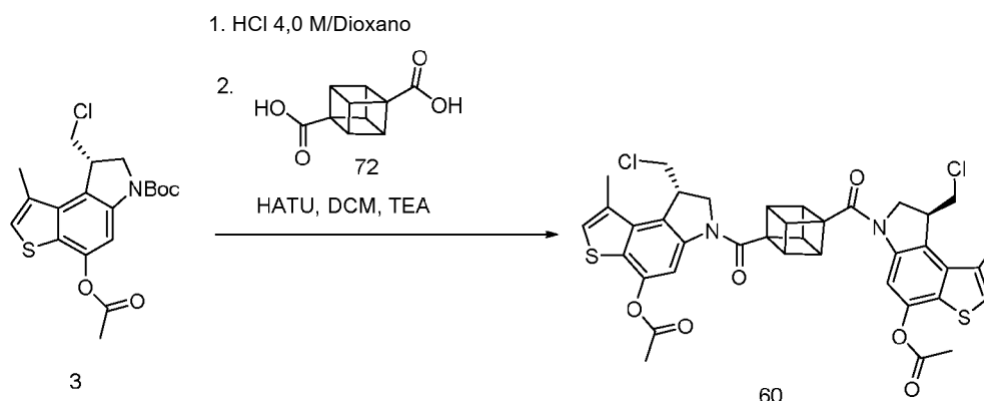
Etapa 6. Síntesis de (4-nitrofenil)carbonato de (S)-8-(clorometil)-6-(5-((S)-8-(clorometil)-1-metil-4-(fosfonooxi)-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-6-il)-5-oxopentanoil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-4-ilo (**55**) y dihidrogenofosfato de (8S)-8-(clorometil)-6-{5-[(8S)-8-(clorometil)-4-hidroxi-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-6-il]-5-oxopentanoil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-4-ilo (**61**)

A una solución de **54** (40 mg, 0,046 mmol) en THF (5 ml) a 0 °C se le añadió una solución de cloroformiato de 4-nitrofenilo (19,4 mg, 0,092 mmol) en DCM (0,5 ml) y DIPEA (0,049 ml, 0,28 mmol). La mezcla se agitó a 0 °C durante 30 min. La reacción se concentró al vacío y el residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice usando un gradiente (0-60 %) de acetona en heptanos para dar el intermedio PNP carbonato en forma de un sólido de color blanco, 48 mg. Se disolvió en DCM (2 ml), se añadieron TFA (2 ml) y tiofenol (0,047 ml, 0,46 mmol) y la mezcla se agitó a ta durante 3 h. La reacción se concentró al vacío y el residuo se purificó por HPLC de fase inversa (Procedimiento C) para dar 17,8 mg (46 %) del producto **55** en forma de un sólido de color blanco (17,8 mg, 46 %). CL-EM (Protocolo B): *m/z* 848,2 [M+H]⁺, tiempo de retención = 1,09 minutos y 5,2 mg (17 %) de producto **61** en forma de una goma CL-EM (Protocolo B): *m/z* 683,2 [M+H]⁺, tiempo de retención = 0,93 minutos

Etapa 7. Síntesis de (4-((23S,26S)-1-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-23-isopropil-21,24-dioxo-26-(3-ureidopropil)-3,6,9,12,15,18-hexaoxa-22,25-diazaheptacosan-27-amido)bencil) etano-1,2-diilbis(metilcarbamato) de (S)-8-(clorometil)-6-(5-((S)-8-(clorometil)-1-metil-4-(fosfonooxi)-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-6-il)-5-oxopentanoil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-4-ilo (**56**)

A una solución de **55** (10,5 mg, 0,012 mmol) en DMF (1 ml) se le añadieron **40** (13,9 mg, 0,014 mmol), lutidina (0,009 ml, 0,074 mmol), DIPEA (0,013 ml, 0,074 mmol) y HOAt (1,7 mg, 0,012 mmol). La mezcla se agitó a ta durante 20 min, se concentró al vacío y el residuo se purificó por HPLC de fase inversa (Procedimiento C) para dar el producto **56** en forma de una espuma de color blanco, 12 mg (60 %). CL-EM (Protocolo B): *m/z* 1619,6 [M+2H]⁺, tiempo de retención = 0,95 minutos

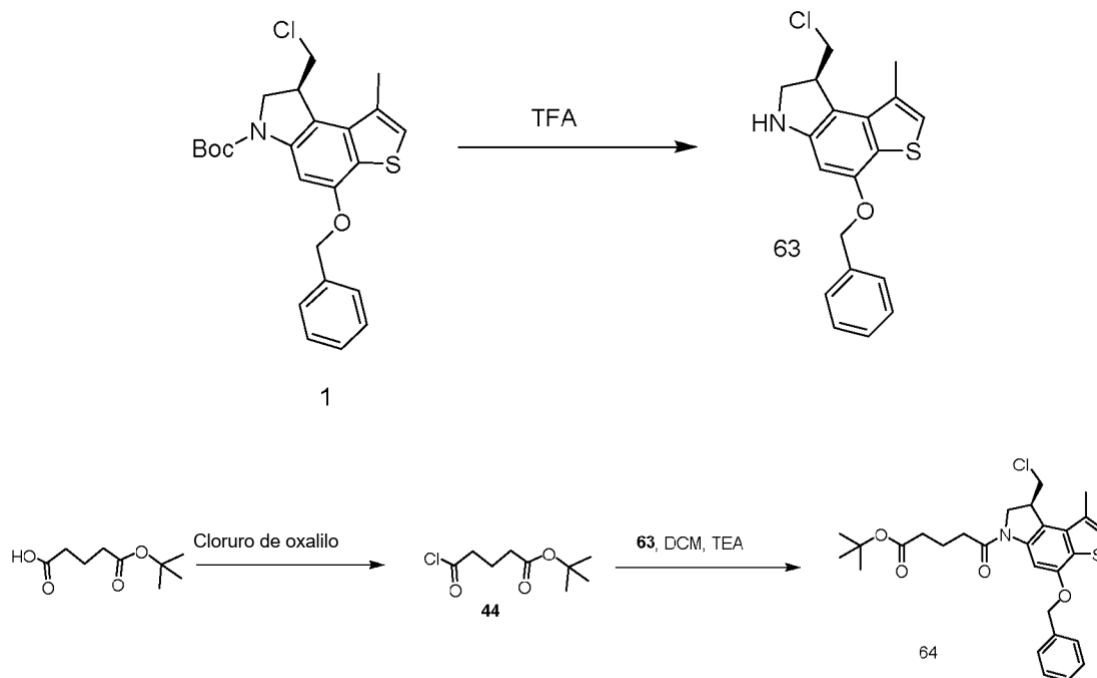
Preparación de diacetato de pentaciclo[4.2.0.0~2,5~.0~3,8~.0~4,7~]octano-1,4-diilbis[carbonil(8S)-8-(clorometil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indolo-6,4-diilo] (**60**)

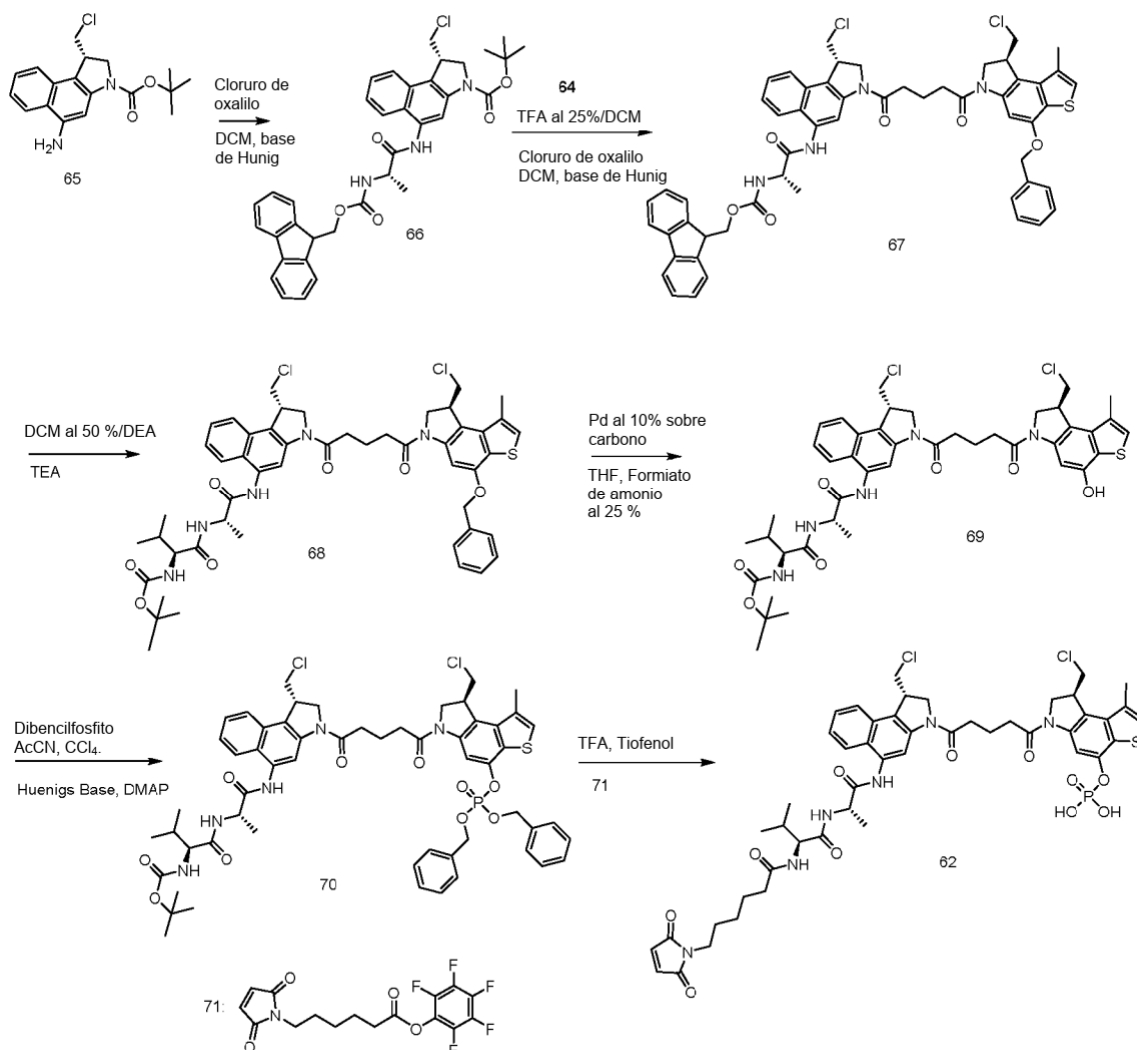


Etapa 1: Síntesis de diacetato de pentaciclo[4.2.0.0~2,5~.0~3,8~.0~4,7~]octano-1,4-diilbis[carbonil(8S)-8-(clorometil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indolo-6,4-diilo] (**60**): Una solución de **3** (47 mg, 0,12 mmol) se trató con HCl 4 M (1,5 ml en dioxano) a ta durante 90 min, se concentró al vacío, el residuo se disolvió en DCM (4 ml) y TEA (0,025 ml), se añadió a una solución de ácido 1,4-cubanodicarboxílico (11,5 mg, 0,06 mmol, **72**) y se disolvió en 1 ml de diclorometano anhidro seguido de la adición de HATU (47 mg, 0,12 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. La mezcla se purificó con una columna de HPLC de fase inversa: (Columna Phenomenex Luna C18 5u 150 x 21,5 mm, Gradiente AcCN al 20 %-90 % / Agua (con AcOH al 0,02 % en cada una) durante 20 min (más un tiempo isocrático inicial de 6 minutos a AcCN al 20 %/agua) con 0,02 % para proporcionar 3,1 mg de **60** (sólido de

color blanco, 7 %). CL-EM (Protocolo A): m/z: 747,1 (M+H)⁺, tiempo de retención = 2,39 min

Preparación de dihidrogenofosfato de (S)-8-(clorometil)-6-(5-((S)-1-(clorometil)-5-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanamido)-3-metilbutanamido)propanamido)-1,2-dihidro-3H-benzo[e]indol-3-il)-5-oxopentanoil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-4-ilo (62)





Etapa 1: Síntesis de (S)-4-(benciloxi)-8-(clorometil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol (63): A una solución agitada del compuesto 1 (300 mg, 0,676 mmol) en DCM seco (5 ml) se le añadió gota a gota HCl 4,0 M en EtOAc (5 ml) a 0 °C. Después de la adición, la mezcla se agitó a ta durante 1,5 h. La mezcla se concentró al vacío y después se co-evaporó una vez con DCM para dar el producto 63 (260 mg, 100 %) que se usó tal cual en la siguiente etapa.

Etapa 2: Síntesis de (S)-5-(4-(benciloxi)-8-(clorometil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-6-il)-5-oxopentanoato de *terc*-butilo (63)

A un matraz de fondo redondo que contenía (S)-4-(benciloxi)-8-(clorometil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indolo-6-carboxilato de *terc*-butilo (1) (500 mg, 1,13 mmol) se le añadió TFA al 25 % en DCM (10 ml). La reacción se agitó durante 30 min. La reacción se concentró y se puso al vacío durante 30 min para dar el residuo de-boc 63 que se recogió en 5 ml de DCM y se usó en la siguiente etapa.

A un matraz de fondo redondo purgado con N₂, que contenía ácido 5-(*terc*-butoxi)-5-oxopentanoico (212 mg, 1,13 mmol) en 5 ml de DCM anhidro, se le añadió cloruro de oxalilo (0,101 ml, 1,13 mmol). A esta solución se le añadió 1 gota de DMF y el sistema se agitó durante 3 horas. Se observó inmediatamente formación de gas. La reacción se concentró al vacío para dar el cloruro de ácido 44 en bruto, que se recogió en DCM y se añadió a un matraz de fondo redondo que contenía el residuo desprotegido 63 descrito anteriormente y TEA (0,144 ml). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción en bruto se concentró al vacío, se recogió en 25 ml de DCM y se transfirió a un embudo de decantación. La fase orgánica se lavó con HCl 1 M (3 x), agua (3 x) y salmuera (2 x). La fase orgánica se secó sobre sulfato sódico y se filtró y el filtrado se concentró para dar un sólido en bruto. El producto en bruto se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (Gradiente: MeOH del 0 % al 10 % en DCM) para dar 64 en forma de un sólido de color amarillo (525 mg, 90 %). CL-EM (Protocolo A): *m/z* 514 [M+H]⁺, tiempo de retención = 2,43 minutos.

Etapa 3: Síntesis de (S)-5-(((S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)propanamido)-1-(clorometil)-1,2-dihidro-3H-benzo[e]indolo-3-carboxilato de *terc*-butilo (**66**).

A un matraz de fondo redondo con (S)-5-amino-1-(clorometil)-1,2-dihidro-3H-benzo[e]indolo-3-carboxilato de *terc*-butilo (1000 mg, 3,0 mmol, **65**) (preparado como se describe en el documento WO2015023355) en 15 ml de DCM se le añadió (S)-1-(cloro-1-oxopropan-2-il)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo (991 mg, 3,0 mmol) seguido de 1,2 ml de base de Hunig. La reacción se agitó durante 1 hora y se concentró para dar un vidrio en bruto. La mezcla de reacción en bruto se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (gradiente: MeOH del 0 % al 10 % en DCM) para dar **66** en forma de un sólido de color blanco (1529 mg, 80 %). CL-EM (Protocolo A): m/z 626 [M+H]⁺, tiempo de retención = 2,32 minutos.

Etapa 4: Síntesis de ((S)-1-(((S)-3-(5-((S)-4-(benciloxi)-8-(clorometil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-6-il)-5-oxopentanoil)-1-(clorometil)-2,3-dihidro-1H-benzo[e]indol-5-il)amino)-1-oxopropan-2-il)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo (**67**)).

A una solución en agitación de (S)-5-(4-(benciloxi)-8-(clorometil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-6-il)-5-oxopentanoato de *terc*-butilo (500 mg, 0,973 mmol, **64**) en 10 ml de DCM se le añadieron 2,5 ml de TFA y la reacción se agitó durante 3 horas. Después de que se completara, la reacción se concentró al vacío para dar un sólido de color blanco pálido. Después, el sólido se recogió en 5 ml de DCM anhidro y cloruro de oxalilo (0,32 ml, 0,93 mmol). La reacción se agitó durante 3 horas y se concentró al vacío para dar un sólido de color blanco. Se recogió (S)-5-(((S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)propanamido)-1-(clorometil)-1,2-dihidro-3H-benzo[e]indolo-3-carboxilato de *terc*-butilo (0,973 mmol, **66**) en TFA al 25 % en DCM (5 ml) y se agitó durante 30 min. La reacción se concentró al vacío y se recogió de nuevo en 5 ml de DCM. Se añadió base de Hunig (0,32 ml) seguido del cloruro de ácido descrito previamente. La reacción se agitó durante 2 horas. Después de que se completara, la mezcla de reacción se concentró al vacío. El producto en bruto se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (Gradiente: MeOH del 0 % al 10 % en DCM) para dar **67** en forma de un sólido de color blanco (510 mg, 54 %). CL-EM (Protocolo A): m/z 965 [M+H]⁺, tiempo de retención = 2,61 minutos.

Etapa 5: Síntesis de ((S)-1-(((S)-1-(((S)-3-(5-((S)-4-(benciloxi)-8-(clorometil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-6-il)-5-oxopentanoil)-1-(clorometil)-2,3-dihidro-1H-benzo[e]indol-5-il)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamato de *terc*-butilo (**68**)).

A una solución en agitación de ((S)-1-(((S)-1-(((S)-3-(5-((S)-4-(benciloxi)-8-(clorometil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-6-il)-5-oxopentanoil)-1-(clorometil)-2,3-dihidro-1H-benzo[e]indol-5-il)amino)-1-oxopropan-2-il)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo (500 mg, 0,518 mmol, **67**) en 5 ml de DCM se le añadieron 5 ml de dietilamina. La reacción se agitó durante 3 horas y se concentró al vacío para dar un sólido de color amarillo. El sólido en bruto de color amarillo se recogió en 10 ml de THF anhidro seguido de (*terc*-butoxicarbonil)-L-valinato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (163 mg, 0,518 mmol) seguido de TEA (0,2 ml). La reacción se agitó a 70 grados Celsius durante 4 horas. Después de que se completara, la mezcla de reacción se concentró al vacío. El producto en bruto se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (Gradiente: MeOH del 0 % al 10 % en DCM) para dar **68** en forma de un sólido de color blanco (198 mg, 40 %). CL-EM (Protocolo A): m/z 942 [M+H]⁺, tiempo de retención = 2,49 minutos.

Etapa 6: Síntesis de ((S)-1-(((S)-1-(((S)-1-(clorometil)-3-(5-((S)-8-(clorometil)-4-hidroxi-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-6-il)-5-oxopentanoil)-2,3-dihidro-1H-benzo[e]indol-5-il)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamato de *terc*-butilo (**69**)).

Una solución en agitación de ((S)-1-(((S)-1-(((S)-3-(5-((S)-4-(benciloxi)-8-(clorometil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-6-il)-5-oxopentanoil)-1-(clorometil)-2,3-dihidro-1H-benzo[e]indol-5-il)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamato de *terc*-butilo (325 mg, 0,345 mmol, **68**) en 7 ml de THF en una atmósfera de nitrógeno se enfrió a 0 °C usando un baño de hielo. Después, se añadió paladio al 10 % en peso sobre carbono activado (10 mg) seguido de la lenta adición gota a gota de 0,5 ml de formiato amónico al 25 % en agua. La reacción se dejó en agitación a 0 °C. durante 1 hora. Después de que se completara, la mezcla de reacción se filtró a través de una capa de celite y el filtrado se concentró al vacío. El producto en bruto se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (gradiente: MeOH del 0 % al 10 % en DCM) para dar **69** en forma de un sólido de color amarillo (181 mg, 61 %). CL-EM (Protocolo A): m/z 852 [M+H]⁺, tiempo de retención = 2,18 minutos.

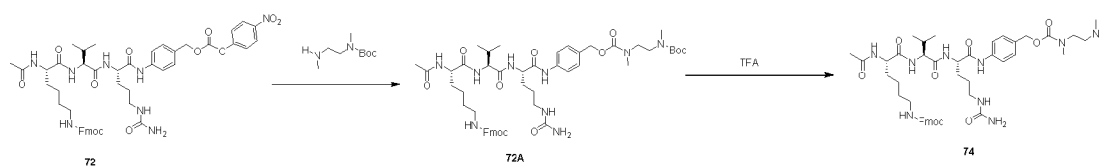
Etapa 7: Síntesis de ((S)-1-(((S)-1-(((S)-3-(5-((S)-4-(bis(benciloxi)fosforil)oxi)-8-(clorometil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-6-il)-5-oxopentanoil)-1-(clorometil)-2,3-dihidro-1H-benzo[e]indol-5-il)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamato de *terc*-butilo (**70**)).

A una solución en agitación de ((S)-1-(((S)-1-(((S)-1-(clorometil)-3-(5-((S)-8-(clorometil)-4-hidroxi-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-6-il)-5-oxopentanoil)-2,3-dihidro-1H-benzo[e]indol-5-il)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamato de *terc*-butilo (165 mg, 0,193 mmol, **69**) en 10 ml de THF y 10 ml de AcCN se le añadió tetracloruro de carbono (2,04 ml, 21,0 mmol) seguido de base de Hunig (1,12 ml, 6,45 mmol), dibencilfosfito (320 mg, 1,16 mmol) y DMAP (catalítico). La reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 20 minutos. La reacción se concentró para dar un vidrio en bruto. La mezcla de reacción en bruto se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (gradiente: MeOH del 0 % al 10 % en DCM) para dar **70** en forma de un vidrio de color blanco (51 mg, 24 %). CL-EM (Protocolo A): m/z 1113 [M-H]⁻, tiempo de retención = 2,50 minutos.

Etapa 8: Síntesis de dihidrogenofosfato de (S)-8-(clorometil)-6-(5-((S)-1-(clorometil)-5-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanamido)-3-metilbutanamido)propanamido)-1,2-dihidro-3H-benzo[e]indol-3-il)-5-oxopentanoil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-4-ilo (**62**)).

En un matraz de fondo redondo equipado con una barra de agitación, se recogió ((S)-1-(((S)-1-(((S)-3-(5-((S)-4-((bis(benciloxi)fosforil)oxi)-8-(clorometil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-6-il)-5-oxopentanoil)-1-(clorometil)-2,3-dihidro-1H-benzo[e]indol-5-il)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamato de *tert*-butilo (40 mg, 0,036 mmol, **70**) en 5 ml de DCM. Se añadieron TFA (2,5 ml) y 2 gotas de tiofenol y la reacción se agitó durante 6 horas. El material en bruto se concentró al vacío. El residuo en bruto se recogió en 3 ml de DMF y se añadió 6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoato de pentafluorofenilo (**71**) (13,6 mg, 0,036 mmol) seguido de TEA (0,036 mmol). La reacción se agitó durante 1 hora. La reacción se concentró al vacío y se purificó por el Procedimiento de HPLC para dar **62** en forma de un sólido de color blanco (25 mg, 68 %), tiempo de retención = 7,115 minutos. CL-EM (Protocolo A): m/z 1025 $[M+H]^+$, tiempo de retención = 2,01 minutos

Preparación de N~2~-acetil-N~6~-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-L-lisil-L-valil-N~5~-carbamoil-N-[4-[(metil[2-(metilamino)etil]carbamoil]oxi)metil]fenil]-L-ornitinamida (74**):**

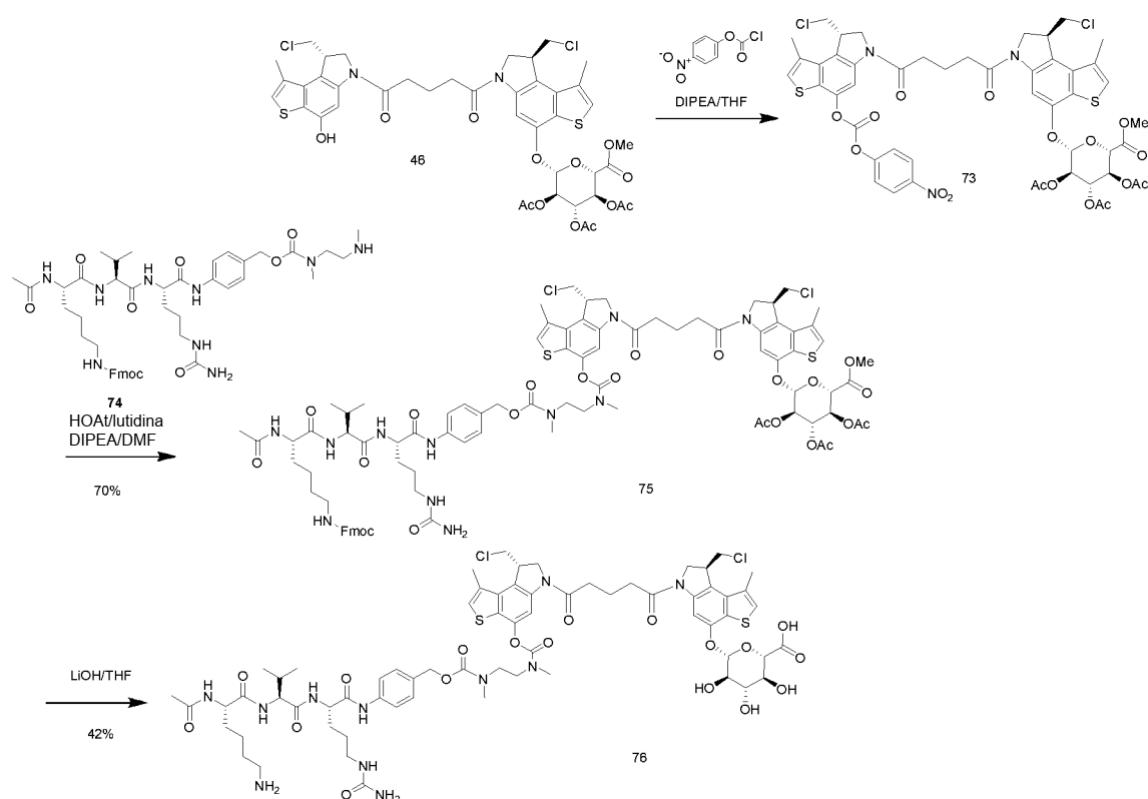


Etapla 1: Síntesis de N~2~-acetil-N~6~-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-L-lisil-L-valil-N~5~-carbamoil-N-[4-(4,7,10,10-tetrametil-3,8-dioxo-2,9-dioxa-4,7-diazaundec-1-il)fenil]-L-ornitinamida (72A**):** A una solución agitada de N~2~-acetil-N~6~-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-L-lisil-L-valil-N~5~-carbamoil-N-[4-[(4-nitrofenoxi)carbonil]oxi]metil]fenil]-L-ornitinamida (**72**) (preparada como se describe en el documento US 9169264) (1,00 g, 1,07 mmol) en DMF (20 ml) se le añadió **38** [preparado como se describe en J. Med. Chem. 1992, 33, 559-567] (241 mg, 1,28 mmol) a 0 °C en un globo de N₂. La mezcla resultante se agitó a 0 °C durante 30 min. La mezcla se vertió en TBME (200 ml). La suspensión de color blanco resultante se filtró y se lavó con TBME (200 ml) para proporcionar el compuesto del título **72A** (750 mg, 71,3 %) en forma de un sólido de color amarillo

Etapla 2: Síntesis de N~2~-acetil-N~6~-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-L-lisil-L-valil-N~5~-carbamoil-N-[4-[(metil[2-(metilamino)etil]carbamoil]oxi)metil]fenil]-L-ornitinamida (74**):** A una suspensión agitada del compuesto **72A** (10,00 g, 10,1 mmol) en DCM (60,0 ml) se le añadió TFA (50,0 ml) a 0 °C. La solución resultante se agitó a 0 °C durante 40 min. La suspensión resultante se filtró. La torta de filtro se lavó con TBME (200 ml) y se secó al vacío a sequedad para proporcionar el producto en bruto. El producto en bruto se purificó por HPLC preparativa (Columna: Phenomenex Synergi Max-RP 250X50 mm, 10 µm, Gradiente: acetonitrilo del 25 % al 55 % en agua con TFA al 0,1 % en cada fase durante 17,5 min y mantenido durante 8 min a acetonitrilo al 100 % en agua que contenía TFA al 0,1 %, Caudal: 80 ml/min) para dar el compuesto del título **74** (5,2 g, rendimiento del 51,3 %) en forma de un sólido de color blanco

¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) □ 10,03 (s, 1H), 8,47 (s a, 2H), 8,10 (d, J = 7,0 Hz, 1H), 8,03 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 7,89 (d, J = 7,5 Hz, 2H), 7,69 (d, J = 7,3 Hz, 3H), 7,60 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 7,45 - 7,38 (m, 2H), 7,36 - 7,29 (m, 4H), 7,26 (t, J = 5,4 Hz, 1H), 6,02 (s a, 1H), 5,01 (s, 2H), 4,43 - 4,33 (m, 1H), 4,32 - 4,16 (m, 5H), 3,49 (t, J = 6,0 Hz, 2H), 3,06-2,92 (m, 6H), 2,86 (s, 3H), 2,62 - 2,53 (m, 3H), 1,99 (dd, J = 6,5, 13,3 Hz, 1H), 1,85 (s, 3H), 1,76 - 1,27 (m, 10H), 0,83 (d, J = 6,8 Hz, 3H), 0,86 (d, J = 6,8 Hz, 3H)

Preparación de LP: ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(((S)-6-(5-((S)-4-(((2-(((S)-2-((S)-2-((S)-2-acetamido-6-aminohexanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil]oxi)carbonil)(metil)amino)etil)(metil)carbamoil]oxi)-8-(clorometil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-6-il)-5-oxopentanoil)-8-(clorometil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-4-il)oxi)-3,4,5-trihidroxitetrahidro-2H-piran-2-carboxílico (76**)**



Etapa 1: Síntesis de triacetato de (2S,3R,4S,5S,6S)-2-(((S)-8-(clorometil)-6-(5-((S)-8-(clorometil)-1-metil-4-(((4-nitrofenoxi)carbonil)oxi)-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-6-il)-5-oxopentanoil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-4-il)oxi)-6-(metoxycarbonil)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo (**73**)

A una solución de **46** (120 mg, 0,13 mmol) en THF (5 ml) a 0 °C se le añadió una solución de cloroformato de 4-nitrofenilo (55 mg, 0,26 mmol) en DCM (0,5 ml), seguido de Et₃N (109 µl, 0,78 mmol) y la mezcla se agitó a 0 °C durante 30 min. La mezcla se concentró al vacío y el residuo se purificó por HPLC de fase inversa (Procedimiento C) para dar el producto **73** en forma de un sólido de color blanco, 109 mg (77 %). CL-EM (Protocolo B): m/z 1086,5 (m+H), tiempo de retención = 1,24 min Etapa 2: Síntesis de triacetato de (2S,3R,4S,5S,6S)-2-(((S)-6-(5-((S)-4-(((2-(((4-(9S,12S,15S)-9-acetamido-1-(9H-fluoren-9-il)-12-isopropil-3,10,13-trioxo-15-(3-ureidopropil)-2-oxa-4,11,14-triazahexadecan-16-amido)encil)oxi)carbonil)(metil)amino)etil)(metil)carbamoil)oxi)-8-(clorometil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-6-il)-5-oxopentanoil)-8-(clorometil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-4-il)oxi)-6-(metoxycarbonil)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo (**75**)

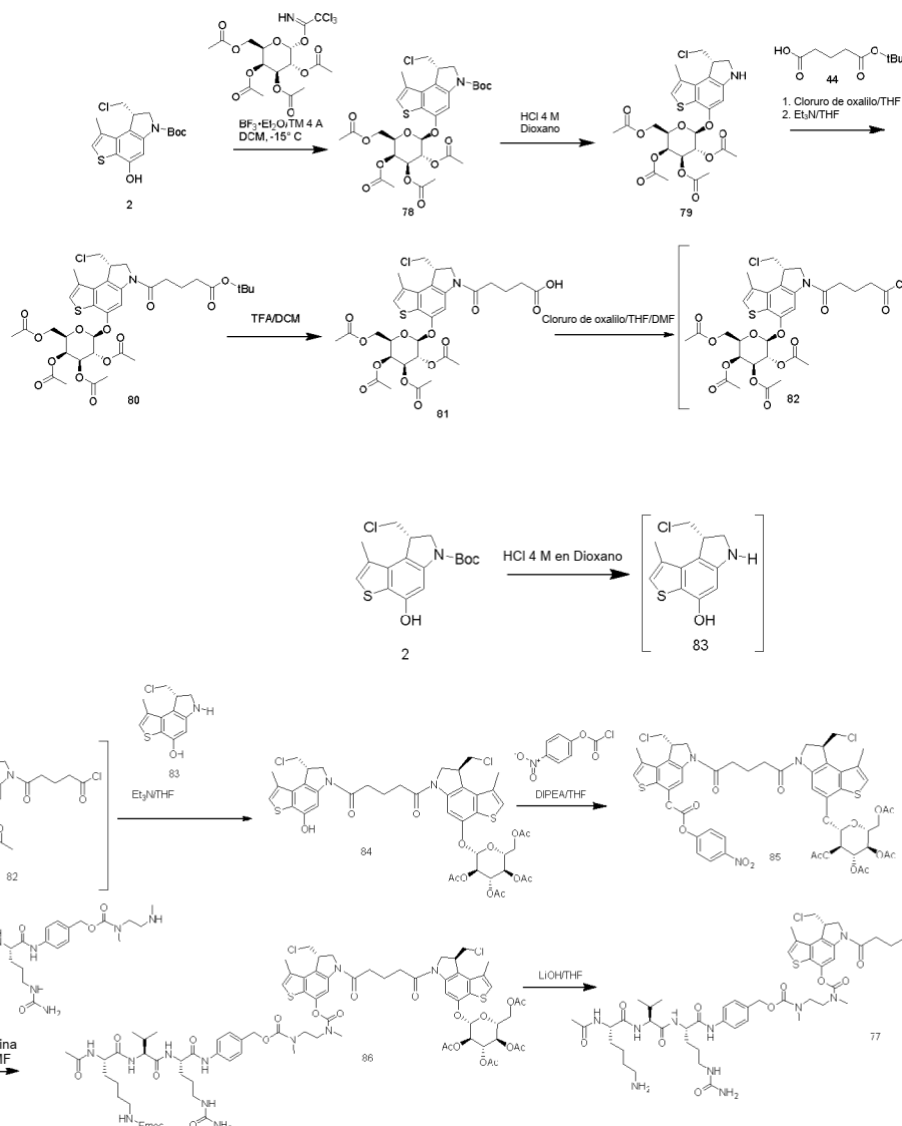
El compuesto **73** (50 mg, 0,046 mmol) en DMF (2 ml) y se le añadieron metil(2-(metilamino)etil)carbamoato de 4-((9S,12S,15S)-9-acetamido-1-(9H-fluoren-9-il)-12-isopropil-3,10,13-trioxo-15-(3-ureidopropil)-2-oxa-4,11,14-triazahexadecan-16-amido)encilo (**74**, 55 mg, 0,055 mmol), lutidina (0,021 ml, 0,18 mmol), DIPEA (0,032 ml, 0,18 mmol) y HOAt (6 mg, 0,046 mmol). La mezcla se agitó a t durante 1 h. La mezcla se concentró al vacío y el residuo se purificó por HPLC de fase inversa (Procedimiento C) para dar el producto **75** en forma de un polvo de color blanco después de la liofilización, 72 mg (85 %). CL-EM (Protocolo B): m/z 1833,3 (M+H) tiempo de retención = 1,17 min ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 10,02 (s a, 1H), 8,22 (s, 1H), 8,19 - 8,13 (m, 1H), 8,10 (d, J = 6,6 Hz, 1H), 8,02 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 7,89 (d, J = 7,4 Hz, 2H), 7,69 (d, J = 7,0 Hz, 3H), 7,57 (d, J = 7,0 Hz, 2H), 7,54 - 7,38 (m, 5H), 7,37 - 7,30 (m, 3H), 7,26 (s a, 3H), 5,99 (s a, 1H), 5,74 (d, J = 7,0 Hz, 1H), 5,64 - 5,49 (m, 1H), 5,20 (t, J = 8,8 Hz, 1H), 5,13 (t, J = 9,6 Hz, 1H), 5,04 (s a, 1H), 5,00 (s a, 1H), 4,81 - 4,70 (m, 1H), 4,39 (s a, 2H), 4,32 - 4,11 (m, 14H), 3,95 - 3,80 (m, 3H), 3,62 (s a, 1H), 3,56 (s a, 1H), 3,48 (s a, 2H), 3,12 (s a, 1H), 3,03 (s a, 2H), 3,00 - 2,91 (m, 6H), 2,88 (s a, 3H), 2,82 - 2,67 (m, 4H), 2,67 - 2,55 (m, 7H), 2,10 (s, 1H), 2,08 - 1,91 (m, 14H), 1,85 (s, 3H), 1,79 - 1,64 (m, 2H), 1,61 (s a, 2H), 1,54 - 1,32 (m, 5H), 1,31 - 1,23 (m, 2H), 1,23 - 1,12 (m, 2H), 0,84 (d, J = 6,6 Hz, 3H), 0,87 (d, J = 6,6 Hz, 3H).

Etapa 3. Preparación de LP: Se disolvió ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(((S)-6-(5-((S)-4-(((2-(((4-((S)-2-((S)-2-((S)-2-acetamido-6-amino)hexanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)encil)oxi)carbonil)(metil)amino)etil)(metil)carbamoil)oxi)-8-(clorometil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-6-il)-5-oxopentanoil)-8-(clorometil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-4-il)oxi)-3,4,5-trihidroxitetrahidro-2H-piran-2-carboxílico (**76**) compuesto **75** (44 mg, 0,024 mmol) en DMF (1 ml), se añadieron THF (5 ml) y MeOH (1 ml), enfriado a 0 °C, LiOH·H₂O (10 mg, 0,24 mmol) y la mezcla se agitó a 0 °C durante 60 min. La mezcla se acidificó mediante la adición de HOAc (30 µl) y se concentró al vacío. El residuo se purificó por HPLC de fase inversa (Procedimiento C) para dar 25,0 mg (66 %) del producto **76** en forma de un polvo de color blanco.

CL-EM (Protocolo B): m/z 1471,1 (M+2H)⁺ tiempo de retención = 0,75 min ¹H RMN (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 8,09

(s a, 2H), 7,97 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 7,68 (s a, 2H), 7,48 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 7,44 - 7,39 (m, 1H), 7,39 - 7,31 (m, 2H), 7,22 - 7,12 (m, 1H), 5,97 (s a, 1H), 5,45 - 5,32 (m, 2H), 5,18 (s a, 1H), 5,06 (d, J = 5,6 Hz, 1H), 4,98 (s a, 1H), 4,92 (s a, 1H), 4,31 (s a, 1H), 4,26 - 4,05 (m, 8H), 3,82 (d, J = 10,0 Hz, 1H), 3,76 (d, J = 10,5 Hz, 1H), 3,70 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 3,66 - 3,57 (m, 1H), 3,57 - 3,44 (m, 5H), 3,43 - 3,36 (m, 2H), 3,36 - 3,28 (m, 3H), 3,12 - 3,07 (m, 2H), 3,05 (s a, 1H), 3,00 - 2,91 (m, 2H), 2,88 (d, J = 9,8 Hz, 3H), 2,80 (s, 2H), 2,72 - 2,59 (m, 4H), 2,59 - 2,37 (m, 22H), 2,02 (s, 2H), 1,97 - 1,83 (m, 3H), 1,78 (s, 3H), 1,69 (td, J = 3,2, 6,4 Hz, 2H), 1,66 - 1,48 (m, 3H), 1,47 - 1,32 (m, 4H), 1,32 - 1,14 (m, 4H), 0,76 (d, J = 6,4 Hz, 3H), 0,79 (d, J = 5,9 Hz, 3H).

Preparación de ((S)-8-(clorometil)-6-(5-((S)-8-(clorometil)-1-metil-4-(((2S,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-6-il)-5-oxopentanoil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-4-il)etano-1,2-diilbis(metilcarbamato) de 4-((S)-2-((S)-2-((S)-2-acetamido-6-aminohexanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencilo (77)



Etapla 1. Síntesis de triacetato de (2R,3S,4S,5R,6S)-2-(acetoximetil)-6-(((S)-6-(*tert*-butoxicarbonil)-8-(clorometil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-4-il)oxi)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo (78)

El compuesto **2** (300 mg, 0,85 mmol) se disolvió en DCM (30 ml), se añadieron tamices moleculares de 4 A (1,5 g, en polvo, <5 micrómetros, activados) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. A la mezcla de reacción se le añadió alfa-D-galactopanososa, 1-2,2,2-tricloroetanimidato de 2,3,4,6-tetraacetato (449 mg, 93 %, 0,85 mmol), la mezcla se enfrió a -15 °C, se añadió lentamente una solución de BF₃·Et₂O (0,052 ml, 0,42 mmol) en DCM (5 ml) y la mezcla de reacción se agitó a -15 °C - -20 °C durante 1 h. La mezcla de reacción se retiró por filtración a través de una capa de Celite, se lavó con acetona y se concentró para dar un residuo. El residuo se trató con MeOH y se concentró al vacío para dar 580 mg (100 %) del producto **78** en forma de un sólido de color blanquecino CL-EM (Protocolo B): m/z: 706,4 (M+Na) tiempo de retención = 1,09 min

Etapla 2. Síntesis de triacetato de (2R,3S,4S,5R,6S)-2-(acetoximetil)-6-(((S)-8-(clorometil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-

tieno[3,2-e]indol-4-il)oxi)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo (**79**)

El compuesto **78** (580 mg, 0,85 mmol) se trató con una solución de HCl 4 M en dioxano (5 ml) durante 30 min y la mezcla se concentró al vacío para dar el producto en bruto **79** en forma de un sólido de color verde que se usó sin purificación adicional CL-EM (Protocolo B): m/z 584,3 (M+H), tiempo de retención = 0,94 min. ¹H RMN (400 MHz, METANOL-d₄) δ = 7,53 (s, 1H), 7,22 (s, 1H), 5,57 - 5,46 (m, 3H), 5,34 (dd, J = 2,0, 9,0 Hz, 1H), 4,53 (d, J = 6,6 Hz, 2H), 4,42 (t, J = 6,4 Hz, 1H), 4,25 (dt, J = 6,4, 11,2 Hz, 2H), 4,18 - 4,01 (m, 5H), 3,74 (dd, J = 8,6, 11,7 Hz, 2H), 3,69 (s, 14H), 2,68 - 2,58 (m, 4H), 2,23 (s, 3H), 2,19 - 2,14 (m, 2H), 2,14 - 2,07 (m, 7H), 2,07 - 1,94 (m, 6H), 1,33 (s, 3H).

Etapas 3. Síntesis de triacetato de (2R,3S,4S,5R,6S)-2-(acetoximetil)-6-(((S)-6-(5-(*terc*-butoxi)-5-oxopentanoil)-8-(clorometil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-4-il)oxi)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo (**80**)

Una solución de ácido 5-(*terc*-butoxi)-5-oxopentanoico (**44**, 191 mg, 1,02 mmol) en THF (10 ml) se enfrió a 0 °C y se añadió cloruro de oxalilo (1,02 ml, 2 M en DCM) seguido de 1 gota de DMF. La mezcla se agitó a 0 °C durante 30 min y se concentró al vacío para dar el cloruro de ácido correspondiente en forma de una cera. Este se disolvió en THF (10 ml) y se añadió a una solución de **79** (526 mg, 0,85 mmol) en THF (10 ml), seguido de Et₃N (0,354 ml, 2,54 mmol). La mezcla se agitó a 0 °C durante 30 min. La mezcla se concentró y el residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice usando un gradiente de acetato de etilo del 0 % al 70 % en heptanos para dar 448 mg (70 %) del producto **80** en forma de un sólido de color blanquecino CL-EM (Protocolo B): m/z 754,4 (M+H), tiempo de retención = 1,06 min

Etapas 4. Síntesis de triacetato de (2R,3S,4S,5R,6S)-2-(acetoximetil)-6-(((S)-8-(clorometil)-6-(5-((S)-8-(clorometil)-4-hidroxi-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-6-il)-5-oxopentanoil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-4-il)oxi)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo (**84**)

Una solución del compuesto **80** (448 mg, 0,59 mmol) se trató con DCM (3 ml) y TFA (2 ml) a ta durante 1 h y la mezcla se concentró al vacío para dar el ácido libre **81** en forma de un sólido de color verde, 212 mg. El ácido **81** (167 mg, 0,24 mmol) se disolvió en THF (5 ml), la solución se enfrió a 0 °C y se añadió cloruro de oxalilo (0,24 ml, 2 M en DCM), seguido de DMF (1 gota). La mezcla se agitó a 0 °C durante 30 min y se concentró al vacío para dar el cloruro de ácido **82** correspondiente que se usó sin purificación adicional en la siguiente etapa. Una solución del compuesto **2** (102 mg, 0,28 mmol) en HCl 4 M (2 ml) en dioxano se agitó a ta durante 1 h y la mezcla se concentró al vacío para dar el compuesto **83** en forma de un sólido de color verde que se disolvió en THF (5 ml) y se enfrió a 0 °C. Se añadió TEA (0,2 ml, 1,44 mmol) seguido de una solución del cloruro de ácido **82** en bruto en THF (5 ml) y la mezcla se agitó a 0 °C durante 20 min. La mezcla se concentró y el residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice usando un gradiente de acetona del 0 % al 70 % en heptanos para dar 196 mg (88 %) del producto **84** en forma de un sólido de color amarillo

CL-EM (Protocolo B): m/z 933,5 (M+H), tiempo de retención = 1,05 min. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 8,26 (s, 1H), 7,94 (s, 1H), 7,46 (s, 1H), 7,39 (s, 1H), 5,51 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 5,42 - 5,26 (m, 3H), 4,59 - 4,46 (m, 1H), 4,33 - 4,23 (m, 2H), 4,23 - 4,15 (m, 4H), 4,15 - 4,07 (m, 2H), 4,04 (s, 4H), 3,87 (dd, J = 10,5, 18,0 Hz, 2H), 3,67 (t, J = 9,8 Hz, 1H), 3,57 (t, J = 10,1 Hz, 1H), 3,33 (s, 1H), 3,31 (s, 1H), 2,83 - 2,67 (m, 2H), 2,60 (dd, J = 6,4, 16,2 Hz, 3H), 2,19 (s, 3H), 2,15 - 2,09 (m, 4H), 2,07 (s, 4H), 1,97 (s, 6H).

Etapas 5. Síntesis de triacetato de (2R,3S,4S,5R,6S)-2-(acetoximetil)-6-(((S)-8-(clorometil)-6-(5-((S)-8-(clorometil)-1-metil-4-(((4-nitrofenoxi)carbonil)oxi)-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-6-il)-5-oxopentanoil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-4-il)oxi)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo (**85**)

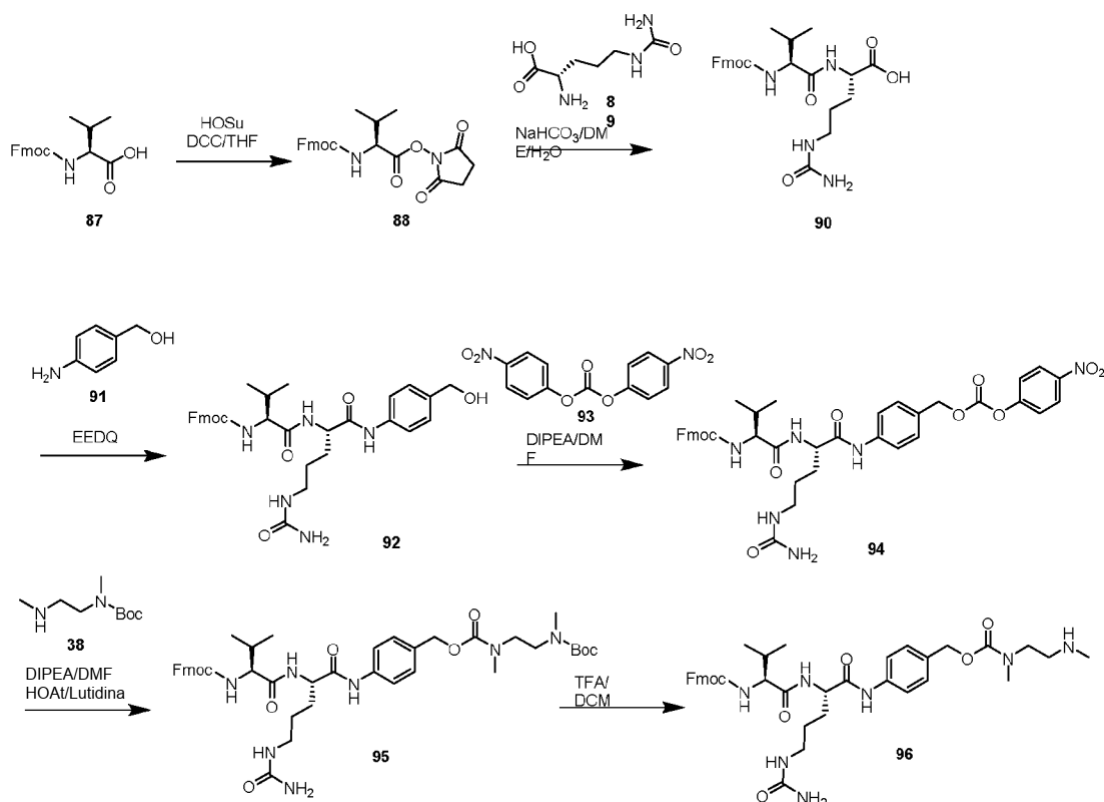
A una solución de **84** (100 mg, 0,107 mmol) en THF (5 ml) a 0 °C se le añadió cloroformiato de 4-nitrofenilo (45 mg, 0,21 mmol) seguido de Et₃N (0,060 ml, 0,43 mmol). La mezcla se agitó a 0 °C durante 60 min. La mezcla se concentró al vacío para dar el producto en bruto en forma de una espuma de color amarillo, 142 mg, que se purificó por HPLC de fase inversa (Procedimiento C) para dar 50 mg (43 %) del producto **85** en forma de un sólido de color blanquecino. CL-EM (Protocolo B): m/z 1098,5 (M+H), tiempo de retención = 1,05 min

Etapas 6. Síntesis de triacetato de (2S,3R,4S,5S,6R)-2-(((S)-6-(5-((S)-4-(((4-((9S,12S,15S)-9-acetamido-1-(9H-fluoren-9-il)-12-isopropil-3,10,13-trioxo-15-(3-ureidopropil)-2-oxa-4,11,14-triazahexadecan-16-amido)bencil)oxi)carbonil)(metil)amino)etil)(metil)carbamoil)oxi)-8-(clorometil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-6-il)-5-oxopentanoil)-8-(clorometil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-4-il)oxi)-6-(acetoximetil)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo (**86**):

A una solución de **85** (50 mg, 0,045 mmol) en DMF (2 ml) se le añadieron metil(2-(metilamino)etil)carbamoato de 4-((9S,12S,15S)-9-acetamido-1-(9H-fluoren-9-il)-12-isopropil-3,10,13-trioxo-15-(3-ureidopropil)-2-oxa-4,11,14-triazahexadecan-16-amido)bencilo (**7445** mg, 0,045 mmol) y DIPEA (0,024 ml, 0,136 mmol). La mezcla se agitó a ta durante 60 min y se purificó usando HPLC de fase inversa (Procedimiento C) para dar 26 mg (31 %) del producto **86** en forma de un sólido de color blanco: CL-EM (Protocolo B): m/z 1847,1 (M+H), tiempo de retención = 1,06 min ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 10,01 (s a, 1H), 8,25 (s, 1H), 8,20 - 8,12 (m, 1H), 8,09 (d, J = 6,6 Hz, 1H), 8,02 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 7,89 (d, J = 7,8 Hz, 2H), 7,69 (d, J = 7,0 Hz, 3H), 7,57 (d, J = 7,4 Hz, 2H), 7,47 - 7,37 (m, 4H), 7,37 - 7,30 (m, 3H), 7,26 (s a, 3H), 5,98 (s a, 1H), 5,50 (d, J = 7,0 Hz, 1H), 5,46 - 5,27 (m, 5H), 5,02 (d, J = 19,1 Hz, 2H), 4,52 (s a, 1H), 4,39 (s a, 1H), 4,32 - 4,14 (m, 13H), 4,14 - 4,03 (m, 1H), 3,95 - 3,81 (m, 2H), 3,75 - 3,59 (m, 6H), 3,56 (s a, 2H), 3,48 (s a, 2H), 3,12 (s a, 1H), 3,03 (s a, 2H), 2,94 (s, 3H), 2,97 (s, 2H), 2,87 (s a, 2H), 2,83 - 2,67 (m, 3H), 2,66 - 2,54 (m, 7H), 2,19 (s, 4H), 2,12 (s, 3H), 2,09 - 2,03 (m, 4H), 2,03 - 1,90 (m, 7H), 1,85 (s, 3H), 1,78 (t, J = 6,4 Hz, 1H), 1,68 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 1,61 (s a, 2H), 1,53 - 1,33 (m, 5H), 1,32 - 1,18 (m, 2H), 0,84 (d, J = 7,0 Hz, 3H), 0,87 (d, J = 6,6 Hz, 3H).

Etapa 7. Síntesis de LP: etano-1,2-diilbis(metilcarbamato) de 4-((S)-2-((S)-2-((S)-2-acetamido-6-aminohexanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencilo ((S)-8-(clorometil)-6-(5-((S)-8-(clorometil)-1-metil-4-(((2S,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahydro-2H-piran-2-il)oxi)-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-6-il)-5-oxopentanoil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-4-ilo) (**77**): A una solución de **86** (24 mg, 0,013 mmol) en THF (2 ml) y MeOH (2 ml), a 0 °C se le añadió a una solución de LiOH (1 M, 0,26 ml, 0,26 mmol) en agua y la mezcla se agitó a 0 °C a ta durante 2 h. Se añadió ácido acético (20 ul), la mezcla se concentró y el residuo se purificó por HPLC de fase inversa (Procedimiento C) para dar 14 mg (69 %) del producto **77** en forma de una espuma de color blanco: CL-EM (Protocolo B): m/z 1456,9 (M+2H)⁺, tiempo de retención = 0,75 min ¹H RMN (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 10,07 - 9,96 (m, 1H), 8,29 - 8,18 (m, 1H), 8,18 - 8,09 (m, 2H), 8,06 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 7,73 (d, J = 8,6 Hz, 1H), 7,66 (s a, 3H), 7,56 (d, J = 7,8 Hz, 2H), 7,50 (d, J = 9,3 Hz, 1H), 7,47 - 7,39 (m, 2H), 7,35 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 7,32 - 7,25 (m, 2H), 6,04 (s a, 1H), 5,11 (d, J = 6,4 Hz, 1H), 5,05 (s a, 1H), 5,01 (s a, 1H), 4,40 (s a, 1H), 4,36 - 4,16 (m, 10H), 4,10 (d, J = 11,7 Hz, 3H), 4,00 (s a, 3H), 3,96 - 3,80 (m, 10H), 3,77 (s a, 4H), 3,73 - 3,55 (m, 11H), 3,52 (s a, 1H), 3,48 (s a, 3H), 3,12 (s a, 1H), 3,05 (s a, 2H), 3,01 - 2,91 (m, 4H), 2,88 (s a, 2H), 2,86 - 2,72 (m, 4H), 2,72 - 2,53 (m, 13H), 2,45 (t, J = 7,5 Hz, 1H), 2,06 - 1,92 (m, 3H), 1,86 (s, 4H), 1,71 - 1,56 (m, 3H), 1,56 - 1,42 (m, 4H), 1,42 - 1,23 (m, 4H), 0,85 (dd, J = 6,6, 14,7 Hz, 6H).

Preparación de metil(2-(metilamino)etil)carbamato de 4-((S)-2-((S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencilo (96**)**



Etapa 1. Síntesis de (((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)-L-valinato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (88**)**

A una solución del compuesto **87** (150 g, 0,442 mol) y HOSu (56 g, 0,487 mol) en THF (1800 ml) se le añadió en porciones DCC (100 g, 0,487 mol) en un baño de hielo. Después de la adición, la reacción se agitó a temperatura ambiente durante una noche. La reacción se enfrió a -5 °C, se filtró y se lavó con THF frío, el filtrado se concentró al vacío y el residuo se recristalizó en MTBE para dar el compuesto **88** en forma de un sólido de color blanco, 175 g (91 %).

Etapa 2. Síntesis de ácido (S)-2-((S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanoico (90**)**

A una solución del compuesto **89** (40,14 g, 0,229 mol) y NaHCO₃ (19,23 g, 0,229 mol) en agua (750 ml) se le añadió gota a gota la solución del compuesto **88** (100 g, 0,229 mol) en DME (750 ml) en un baño de hielo. Durante la adición, se formó una suspensión de color blanco. Se añadió más cantidad de THF (400 ml) para mejorar la solubilidad. Después de la adición, la solución se agitó a 25 - 30 °C durante 2 días. A la reacción se le añadió K₂CO₃ ac. saturado para ajustar el pH a 8 - 9, y después se extrajo con EtOAc (500 ml x 5). La fase acuosa se ajustó a pH 3 - 4 con ácido cítrico ac. Se formó un material gelatinoso y se filtró. La torta húmeda se disolvió en THF (1,5 l). Se añadió metanol hasta que el sólido se disolvió. La solución se concentró al vacío para retirar el 30 % del disolvente y después se enfrió a temperatura ambiente. A la solución se le añadió TBME (2 l) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una noche. La mezcla se filtró y la torta húmeda se secó al vacío para dar el compuesto **90** en forma de un sólido de

color blanco, 60 g (53 %).

Etapa 3. Síntesis de ((S)-1-(((S)-1-((4-(hidroximetil)fenil)amino)-1-oxo-5-ureidopentan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo (**92**)

A la suspensión del compuesto **90** (70 g, 0,141 mol) en DCM/MeOH (1 L/500 ml) se le añadió el compuesto **91** (34,7 g, 0,282 mol) seguido de EEDQ (69,7 g, 0,282 mol). La mezcla se agitó a 40 °C durante una noche. La mezcla de reacción se filtró y la torta húmeda se suspendió en EtOAc/TBME (500 ml/200 ml), se agitó durante 30 min y después se filtró. El sólido se lavó con EtOAc/TBME para proporcionar el compuesto **92** en forma de un sólido de color blanquecino, 65 g (77 %). ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 9,98 (s, 1H), 8,11 (d, 1H), 7,87 (d, 2H), 7,77 (m, 2H), 7,52 (d, 2H), 7,39 (m, 3H), 7,30 (m, 2H), 7,21 (d, 2H), 5,97 (m, 1H), 5,41 (s, 2H), 5,10 (m, 1H), 4,42 (m, 3H), 4,22 (m, 3H), 3,90 (m, 1H), 2,93 (m, 2H), 1,98 (m, 1H), 1,50 (m, 2H), 1,30 (m, 2H), 0,84 (m, 6H).

Etapa 4. Síntesis de ((S)-3-metil-1-(((S)-1-((4-(((4-nitrofenoxi)carbonil)oxi)metil)fenil)amino)-1-oxo-5-ureidopentan-2-il)amino)-1-oxobutan-2-il)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo (**94**)

A una solución de ((S)-1-(((S)-1-((4-(hidroximetil)fenil)amino)-1-oxo-5-ureidopentan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo (**92**) en DMF anhidra (120 ml) se le añadió en porciones carbonato de bis(4-nitrofenilo) (3,78 g, 12,4 mmol, **93**), seguido gota a gota de DIPEA (1,21 g, 9,32 mmol) a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante una noche. El análisis por TLC (MeOH: CH₂Cl₂ = 1:10) mostró que la reacción se había completado. La mezcla de reacción se añadió gota a gota a MTBE (2,5 l) con agitación. El producto en bruto se recogió por filtración. La torta de filtro se lavó con MTBE y se secó a alto vacío para proporcionar el compuesto **94** en forma de un sólido de color pardo, 2,7 g (57 %).

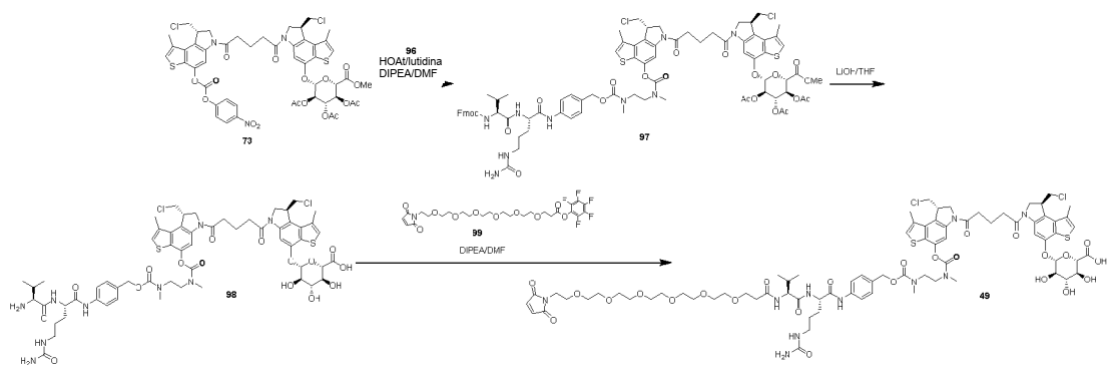
Etapa 5. Síntesis de etano-1,2-diilbis(metilcarbamato) de 4-((S)-2-((S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil *terc*-butilo (**95**)

A una solución del compuesto **94** (1,7 g, 2,217 mmol) en DMA (15 ml) se le añadieron HOAT (332 mg, 2,44 mmol) y 2,6-lutidina (950 mg, 8,87 mmol) a 0 °C. La mezcla se agitó a 0 °C durante 5 minutos. Después, a la mezcla se le añadió metil(2-(metilamino)etil)carbamato de *terc*-butilo (38,459 mg, 2,44 mmol) a 0 °C seguido de DIPEA (860 mg, 6,65 mmol) a 0 °C. La mezcla se agitó a ta durante 1 h, se vertió en TBME (800 ml), se agitó durante 30 min, se filtró y la torta de filtro se concentró al vacío para dar el producto en bruto (1,06 g) en forma de un sólido de color amarillo. El producto en bruto se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (Gradiente: DCM:MeOH = 100:1-10:1) para dar el producto **95** en forma de un sólido de color blanco, 600 mg (33 %).

Etapa 6. Síntesis de metil(2-(metilamino)etil)carbamato de 4-((S)-2-((S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencilo (**96**)

A una solución agitada del compuesto **95** (600 mg, 0,735 mmol) en DCM seco (10 ml) se le añadió TFA (5 ml) a 0 °C y se agitó a 0 °C durante 1 h. La mezcla se concentró al vacío para dar el compuesto del título **96** en forma de un sólido de color blanco, 550 mg (100 %). ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 10,09 (a, 1H), 8,40 (s, 2H), 8,14 (d, 1H), 7,90 (d, 2H), 7,74 (m, 2H), 7,61 (d, 2H), 7,43 (m, 3H), 7,33 (m, 4H), 6,00 (s, 1H), 5,43 (s, 2H), 5,02 (s, 2H), 4,42-4,23 (m, 4H), 3,93 (m, 1H), 3,50 (m, 2H), 3,08-2,94 (m, 4H), 2,88 (s, 3H), 2,59 (m, 3H), 1,99 (m, 1H), 1,69-1,59 (m, 2H), 1,46-1,39 (m, 2H), 0,90-0,85 (m, 6H).

Preparación alternativa de ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(((S)-8-(clorometil)-6-(5-((S)-8-(clorometil)-4-(((2-(((4-((23S,26S)-1-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-23-isopropil-21,24-dioxo-26-(3-ureidopropil)-3,6,9,12,15,18-hexaoxa-22,25-diazaheptacosan-27-amido)bencil)oxi)carbonil)(metil)amino)etil)(metil)carbamoi)oxi)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-6-il)-5-oxopentanoil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-4-il)oxi)-3,4,5-trihidroxitetrahidro-2H-piran-2-carboxílico (49**)**



Etapa 1: Síntesis de triacetato de (2S,3R,4S,5S,6S)-2-(((S)-6-(5-((S)-4-(((2-(((4-((S)-2-((S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)oxi)carbonil)(metil)amino)etil)(metil)carbamoi)oxi)-8-(clorometil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-6-il)-5-oxopentanoil)-8-(clorometil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-4-il)oxi)-6-(metoxycarbonil)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo (**97**)

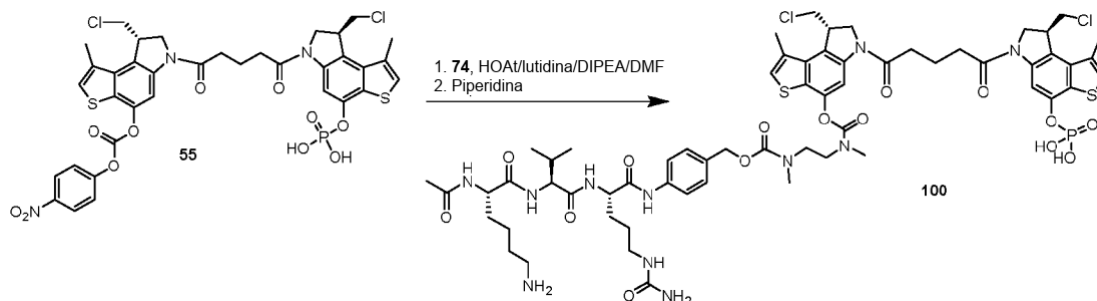
A una solución del compuesto **73** (26 mg, 0,024 mmol) en DMF (1,5 ml) se le añadieron el enlazador Fmoc-VCPABC-DMEA **96** (24 mg, 0,029 mmol), 2,6-lutidina (0,0167 ml, 0,14 mmol), DIPEA (0,0253 ml, 0,14 mmol) y HOAt (3,3 mg, 0,024 mmol). La mezcla se agitó a ta durante 30 min y se concentró al vacío para dar un residuo. El producto en bruto se sometió a purificación por HPLC (Procedimiento C) para dar el producto **97** en forma de

un sólido de color blanco, 33 mg (83 %). CL-EM (Protocolo B): m/z 1660,9 (M+H), tiempo de retención = 1,11 min.

Etapa 2: Síntesis de ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(((S)-6-(5-((S)-4-(((2-(((4-((S)-2-((S)-2-amino-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)oxi)carbonil)(metil)amino)-etil)(metil)carbamoil)oxi)-8-(clorometil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-6-il)-5-oxopentanoil)-8-(clorometil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-4-il)oxi)-3,4,5-trihidroxitetrahydro-2H-piran-2-carboxílico (**98**): A una solución de **97** (46 mg, 0,028 mmol) en THF (3 ml) y MeOH (3 ml), enfriada a 0 °C, se le añadió una solución de LiOH·H₂O (12 mg, 0,28 mmol) en agua (0,5 ml). La mezcla se agitó a 0 °C durante 1 h. Se añadió AcOH (0,03 ml) para neutralizar la mezcla y se concentró al vacío para dar un residuo sólido de color blanco. Se purificó por HPLC (Procedimiento C) para dar el producto **98** en forma de un sólido de color blanquecino, 28 mg (72 %). CL-EM (Protocolo B): m/z 1300,6 (M+H), tiempo de retención = 0,78 min. ¹H RMN (400 MHz, DMF) δ = 10,33 - 10,21 (m, 1H), 8,84 (d, J = 7,4 Hz, 1H), 8,63 (s a, 3H), 8,41 - 8,28 (m, 2H), 8,05 (s, 1H), 7,81 - 7,63 (m, 2H), 7,57 - 7,41 (m, 3H), 7,38 (s a, 2H), 6,52 (s a, 1H), 5,39 (d, J = 6,6 Hz, 1H), 5,17 (s a, 1H), 5,12 (s a, 1H), 4,74 (s a, 1H), 4,48 - 4,28 (m, 5H), 4,24 (s a, 1H), 4,09 (s, 4H), 4,04 - 3,89 (m, 2H), 3,84 - 3,67 (m, 6H), 3,67 - 3,52 (m, 4H), 3,32 (s, 9H), 3,26 (s a, 2H), 3,19 (s a, 1H), 3,14 - 3,04 (m, 4H), 3,00 (s, 2H), 2,94 (s a, 2H), 2,85 (s a, 2H), 2,79 - 2,68 (m, 5H), 2,62 (s, 4H), 2,64 (s, 3H), 2,42 - 2,29 (m, 1H), 2,23 - 2,05 (m, 11H), 1,92 (s a, 1H), 1,78 (s a, 1H), 1,60 (s a, 2H), 1,15 (s a, 6H).

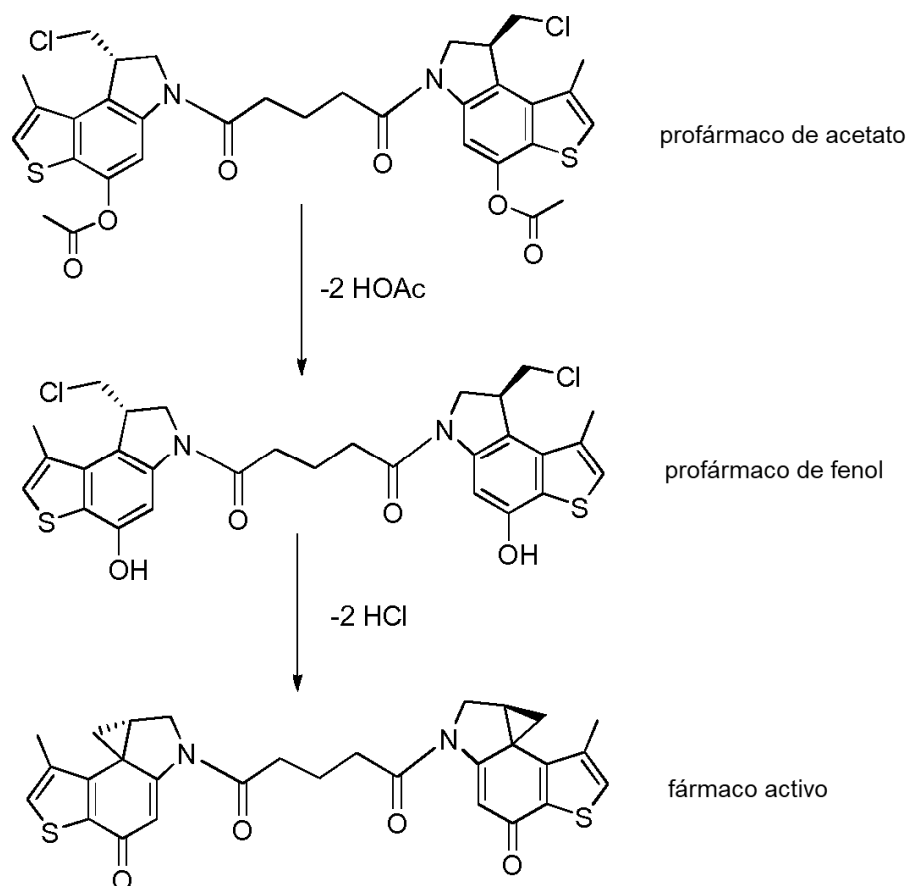
Etapa 3: Síntesis de ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(((S)-8-(clorometil)-6-(5-((S)-8-(clorometil)-4-(((2-(((4-((2S,26S)-1-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-23-isopropil-21,24-dioxo-26-(3-ureidopropil)-3,6,9,12,15,18-hexaoxa-22,25-diazaheptacosan-27-amido)bencil)oxi)carbonil)(metil)amino)etil)(metil)carbamoil)oxi)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-6-il)-5-oxopentanoil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-4-il)oxi)-3,4,5-trihidroxitetrahydro-2H-piran-2-carboxílico (**49**): Una solución de **98** (10 mg, 0,007 mmol) se disolvió en DMF (1 ml) y se le añadieron 1-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-3,6,9,12,15,18-hexaoxahenicosan-21-oato de perfluorofenilo (5,6 mg, 0,009 mmol, **99**) y DIPEA (0,007 ml, 0,042 mmol). La mezcla se agitó a ta durante 30 min. La mezcla se purificó por HPLC (Procedimiento C) para dar el producto **49** en forma de una espuma de color blanco, 10 mg (82 %). CL-EM (Protocolo B): m/z 1715,7 (M+H), tiempo de retención = 0,89 min. ¹H RMN (400 MHz, ACETONITRILLO-d₃) δ = 8,21 (s a, 2H), 7,56 (d, J = 7,4 Hz, 1H), 7,31 - 7,10 (m, 4H), 6,78 (s, 2H), 5,25 (s a, 1H), 5,11 (s a, 1H), 5,02 (s a, 1H), 4,50 (s a, 1H), 4,18 (s a, 2H), 3,77 (s a, 2H), 3,71 (s a, 3H), 3,66 - 3,42 (m), 3,37 - 3,24 (m, 4H), 3,16 (s a, 1H), 3,12 - 2,95 (m, 4H), 2,93 (s, 2H), 2,77 - 2,47 (m, H), 2,22 - 2,02 (m, 4H), 1,51 (s a, 2H), 0,95 (s a, 6H).

Preparación de ((S)-8-(clorometil)-6-(5-((S)-8-(clorometil)-1-metil-4-(fosfonooxi)-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-6-il)-5-oxopentanoil)-1-methy)-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-4-il)etano-1,2-diilbis(metilcarbamato) de 4-((S)-2-((S)-2-acetamido-6-aminohexanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencilo (100**)**



Etapa 1: Síntesis de ((S)-8-(clorometil)-6-(5-((S)-8-(clorometil)-1-metil-4-(fosfonooxi)-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-6-il)-5-oxopentanoil)-1-metil-7,8-dihidro-6H-tieno[3,2-e]indol-4-il)etano-1,2-diilbis(metilcarbamato) de 4-((S)-2-((S)-2-acetamido-6-aminohexanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencilo (**100**): A una solución de **55** (35 mg, 0,041 mmol) en DMF (3 ml) se le añadieron **74** (45 mg, 0,045 mmol), lutidina (0,019 ml, 0,16 mmol), DIPEA (0,029 ml, 0,16 mmol) y HOAt (5,6 mg, 0,041 mmol). La mezcla se agitó a ta durante 3 h. A la mezcla resultante se le añadió piperidina (0,3 ml, 3 mmol) y se agitó a ta durante 20 min. La mezcla se concentró al vacío y el residuo se purificó por HPLC (Procedimiento C) para dar el producto **100** en forma de un polvo de color blanco después de la liofilización, 35 mg (62 %). CL-EM (Protocolo B): m/z 1374,8 (M+H), tiempo de retención = 0,92 min. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 8,45 (d, J = 13,7 Hz, 1H), 8,14 (s, 1H), 8,17 (s, 1H), 8,05 (d, J = 7,4 Hz, 1H), 7,76 (s a, 3H), 7,58 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 7,52 - 7,39 (m, 2H), 7,30 - 7,16 (m, 1H), 6,09 (s a, 1H), 5,15 - 4,94 (m, 2H), 4,40 (s a, 1H), 4,35 - 4,08 (m, 8H), 3,95 - 3,79 (m, 2H), 3,69 (s a, 1H), 3,60 (d, J = 10,5 Hz, 3H), 3,49 (s a, 3H), 3,13 (s a, 1H), 3,06 (s a, 1H), 3,03 - 2,91 (m, 4H), 2,88 (s, 2H), 2,76 (s a, 4H), 2,61 (d, J = 6,6 Hz, 2H), 2,56 (s, 6H), 1,98 (m, 3H), 1,86 (s, 3H), 1,65 (m, 3H), 1,58 - 1,49 (m, 3H), 1,46 (m, 2H), 1,40 - 1,20 (m, 3H), 0,85 (m, 6H).

Tal como se indica en el presente documento, los compuestos descritos en las Tablas 1 y 2 pueden existir en su etapa de profármaco de acetato o fenol, que se convierten ambos rápidamente en la especie de fármaco activo bis ciclopropilo. Esta interconversión tiene lugar rápidamente en el medio de ensayo. Por lo tanto, las tres formas del compuesto son funcionalmente equivalentes y dan como resultado los mismos valores inhibidores del crecimiento en los ensayos de proliferación de células cancerosas. Por lo tanto, describir compuestos como "bis-acetatos" también implica la descripción como sus especies de fenol y bis ciclopropilo funcionalmente equivalentes.

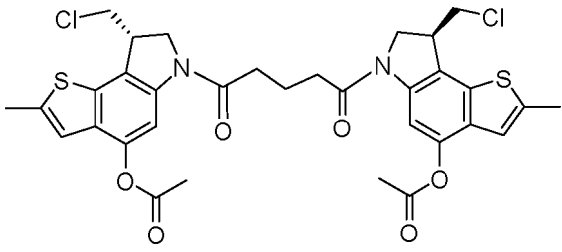
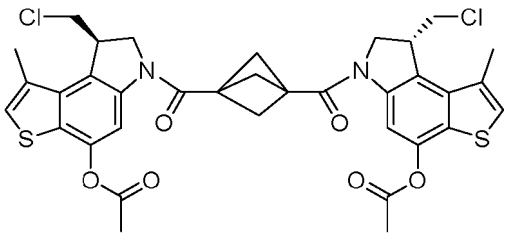
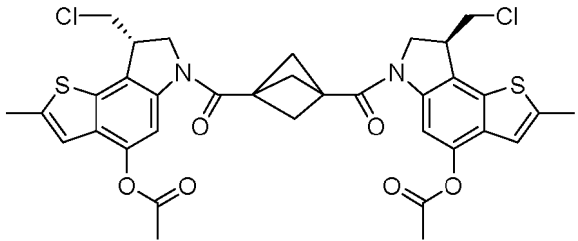
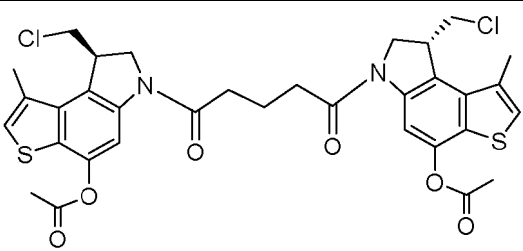
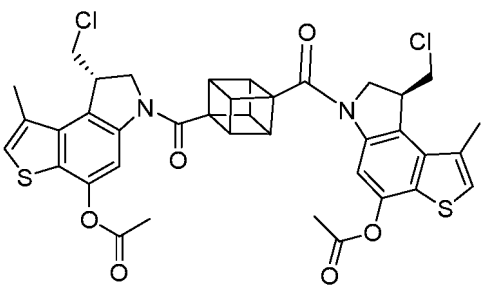
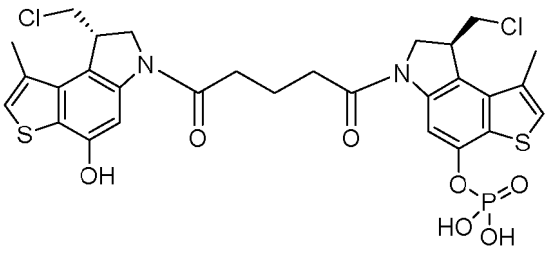


Se prepararon las siguientes cargas útiles o cargas de referencia. Todas las cargas útiles o de referencia se prepararon utilizando los procedimientos generales A y B o mediante los procedimientos indicados

Tabla 1: Ejemplos de cargas útiles o cargas útiles de referencia

Estructura	ID del compuesto	Tiempo de retención por LC-MS (Procedimiento)	m/z [M+H] ⁺
	24	1,11 min (Protocolo B)	687,2
	7	1,12 min (Protocolo B)	711,1

(continuación)

Estructura	ID del compuesto	Tiempo de retención por LC-MS (Procedimiento)	m/z [M+H] ⁺
	26	1,11 min (Protocolo B)	687,2
	12	1,12 min (Protocolo B)	711,1
	17	1,12 min (Protocolo B)	711
	25	1,11 min (Protocolo B)	687,1
	60	2,39 min (Protocolo A)	747
	61	0,93 min (Protocolo B)	683

(continuación)

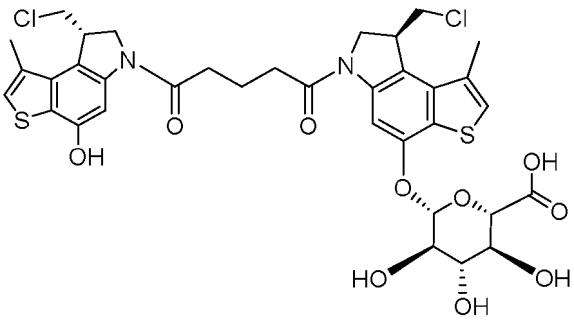
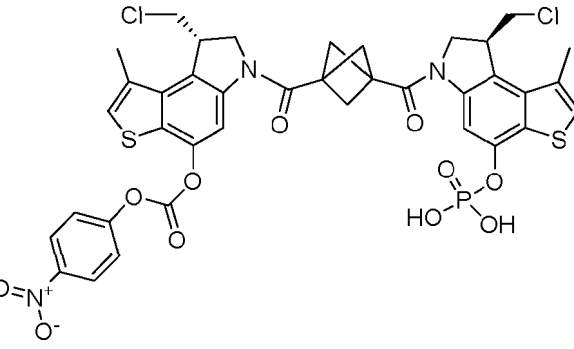
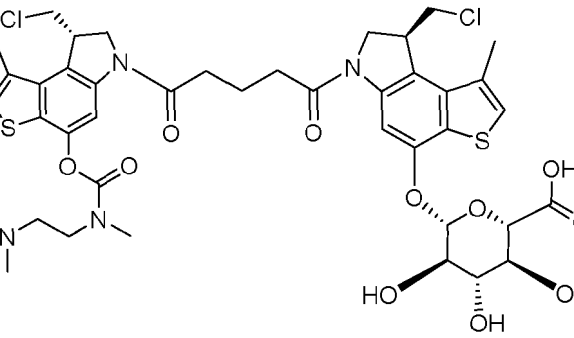
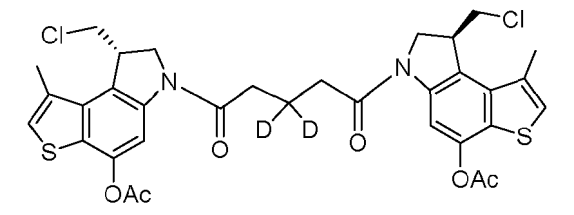
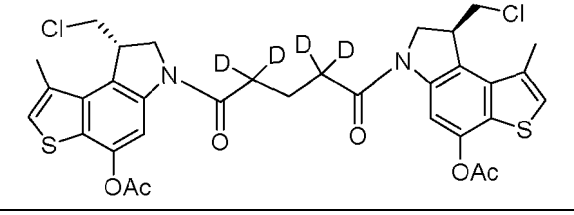
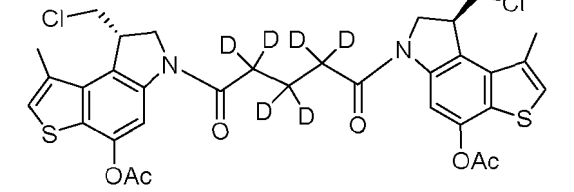
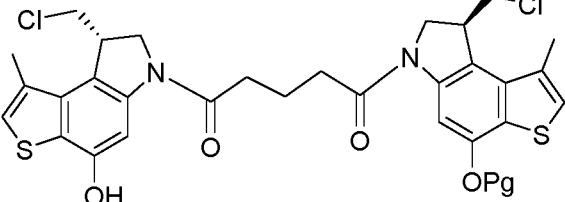
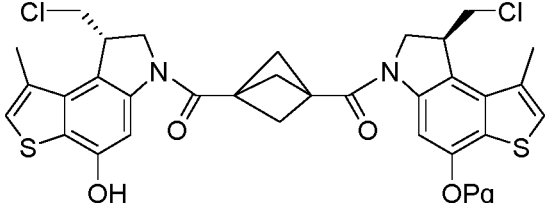
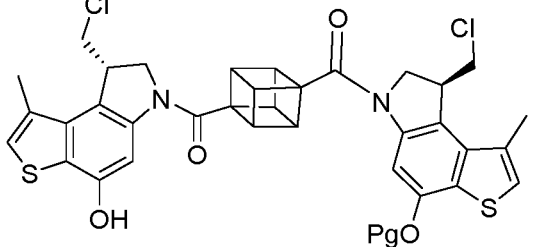
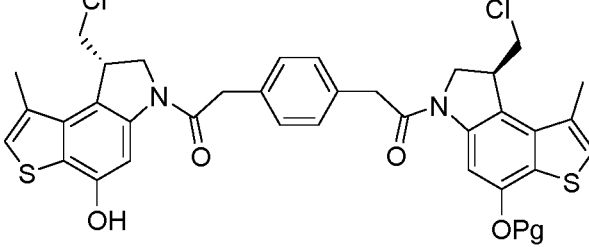
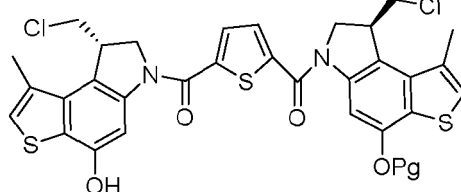
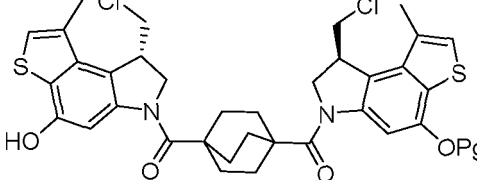
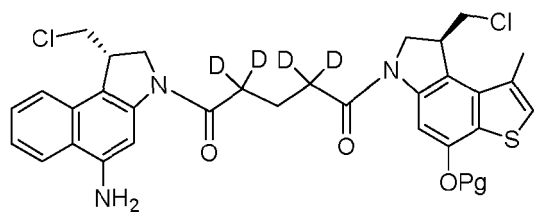
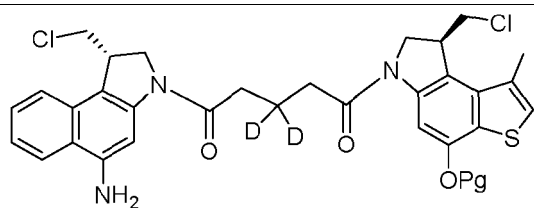
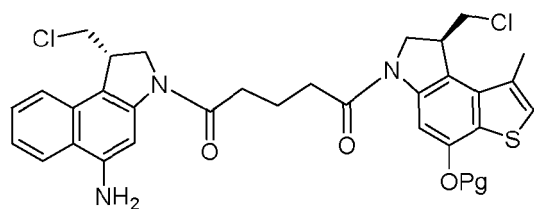
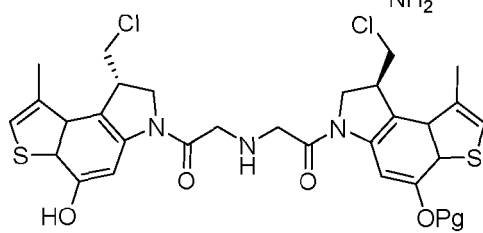
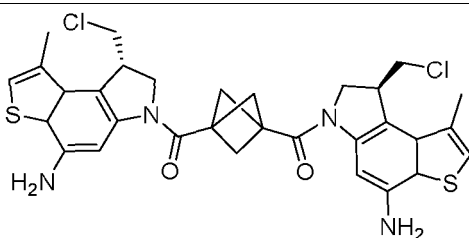
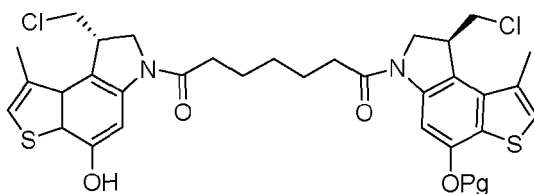
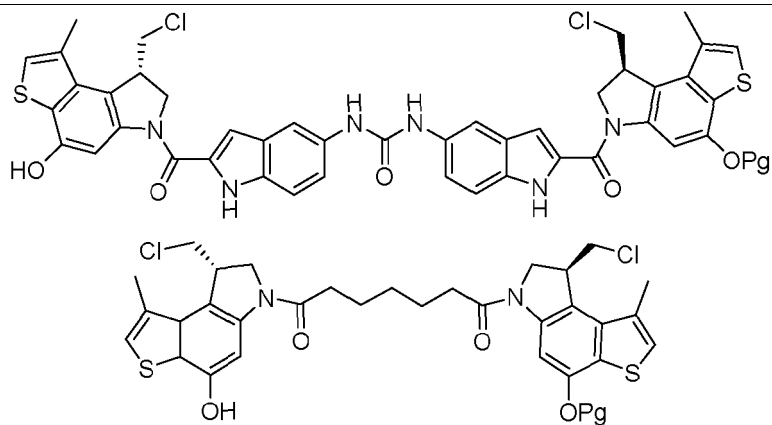
Estructura	ID del compuesto	Tiempo de retención por LC-MS (Procedimiento)	m/z [M+H] ⁺
	57	0,9 min (Protocolo B)	779
	33	1,86 min (Protocolo A)	872
	59	0,74 min (Protocolo B)	893
	87	2,25 min (Protocolo A)	689,3
	88	2,25 min (Protocolo A)	691,3
	89	2,25 min (Protocolo A)	693,3

Tabla 2: Las siguientes cargas útiles o cargas de referencia se preparan utilizando los procedimientos sintéticos generales A y B.

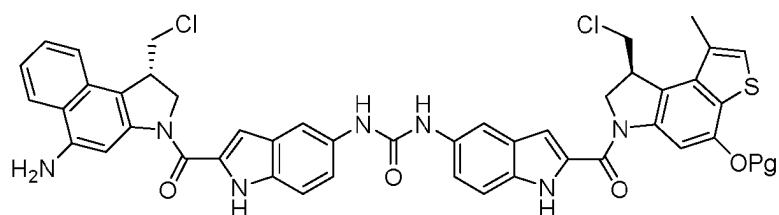
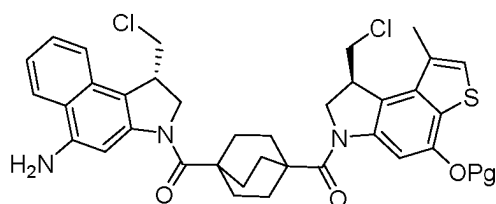
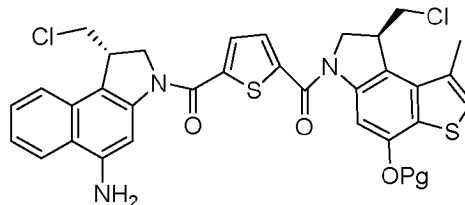
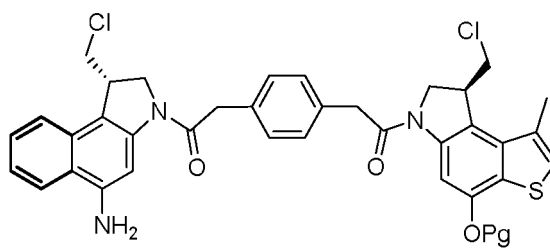
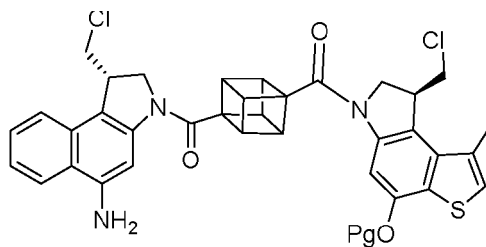
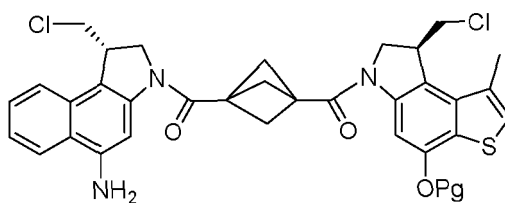
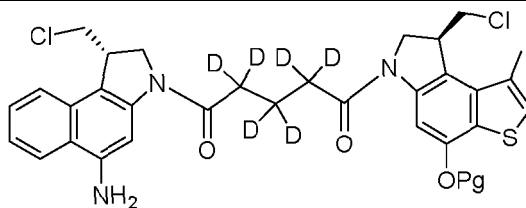
Estructura







(continuación)

Estructura

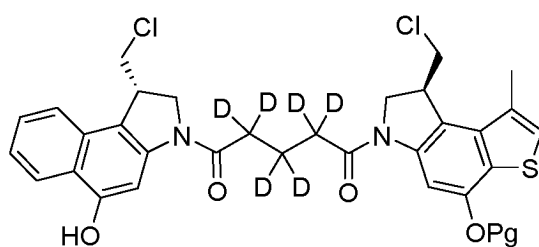
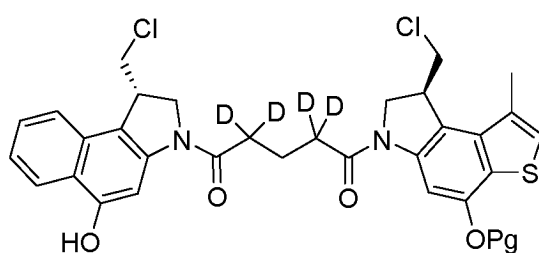
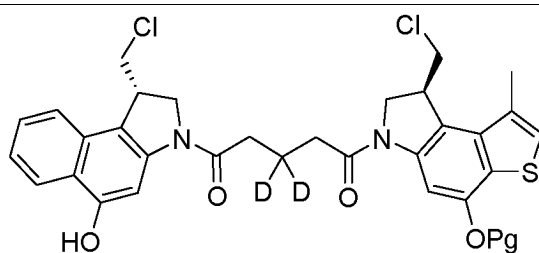
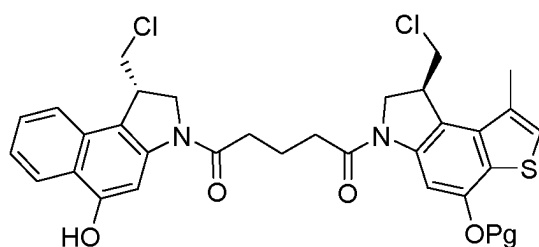
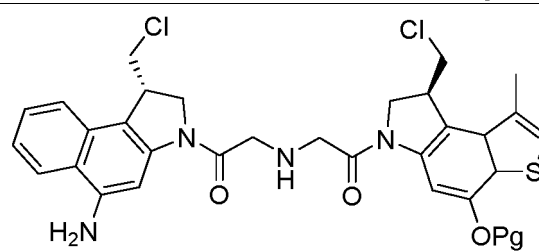
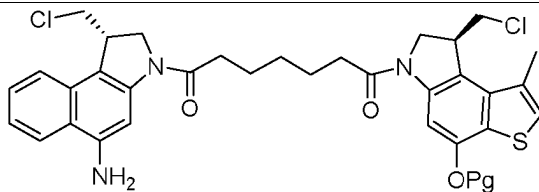


(continuación)
Estructura



(continuación)

Estructura



En los ejemplos anteriores, la variable Pg es H, acilo, fosfato PO_3H_2 , un carbohidrato, un aminoácido o un péptido (y en particular un péptido que es escindido por proteasas, tales como catepsinas y metaloproteinasas de matriz).

Se prepararon los siguientes enlazadores/cargas útiles o enlazadores de referencia/cargas útiles:

Tabla 3. Enlazador-carga útil preparados o enlazador-carga útil de referencia

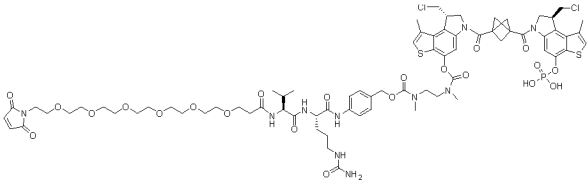
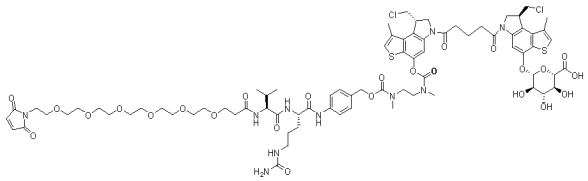
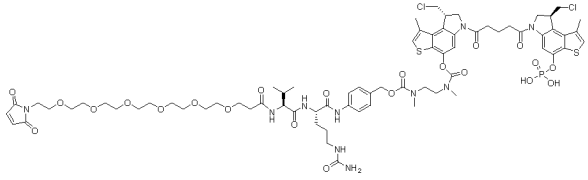
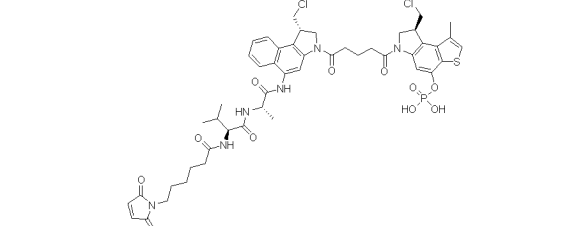
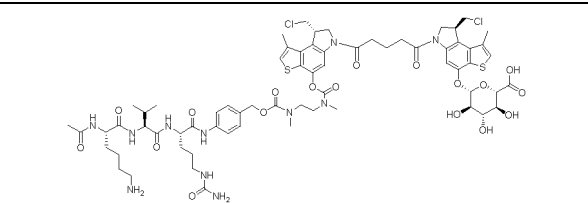
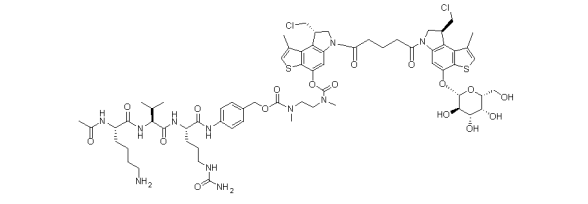
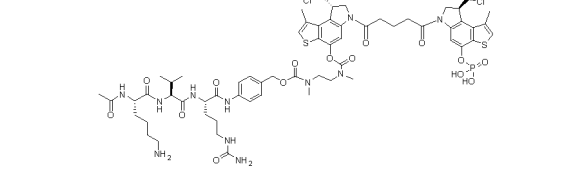
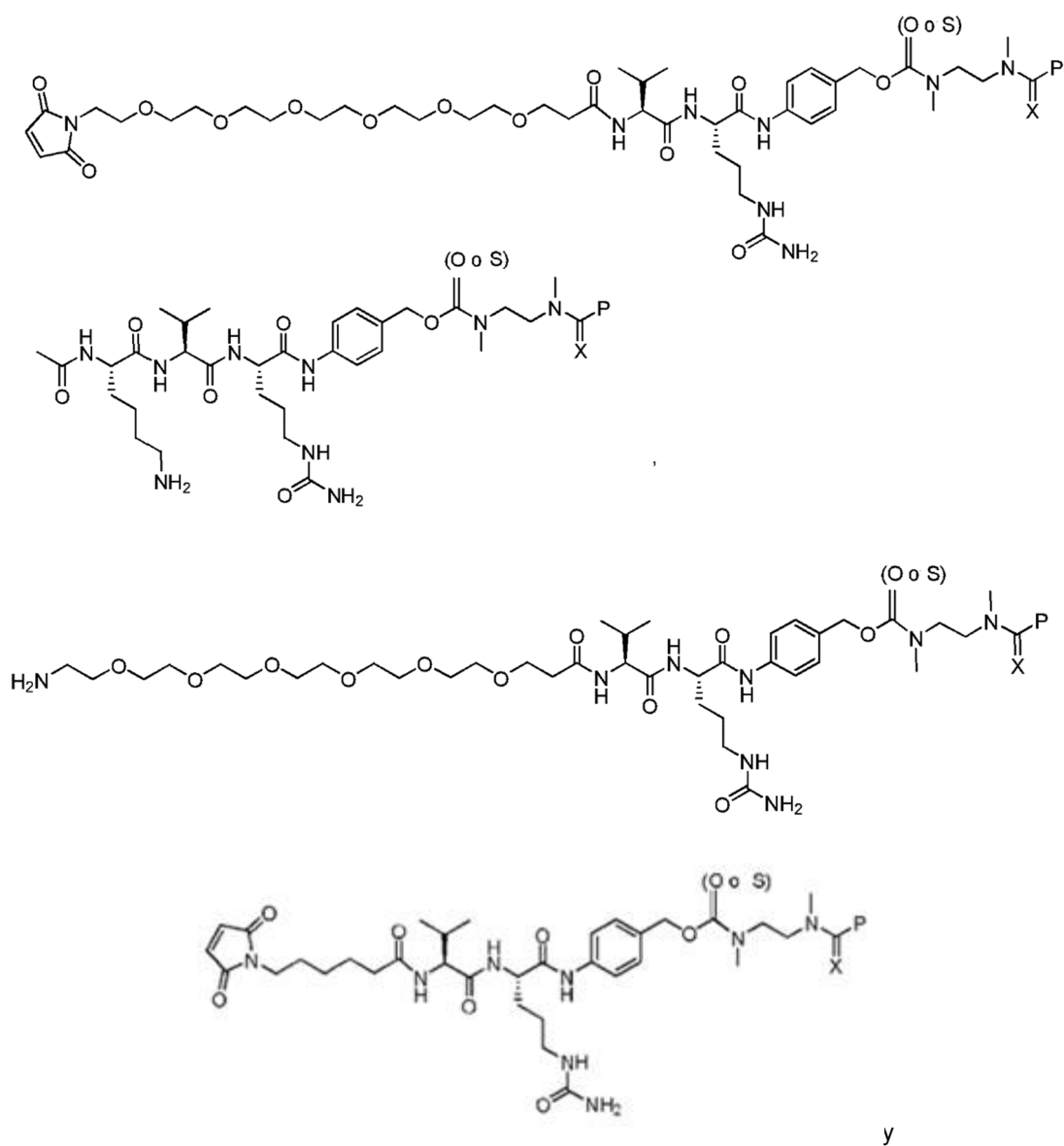
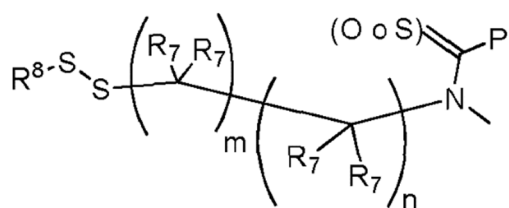
Estructura	ID del compuesto	Tiempo de retención por LC-MS (Procedimiento)	Ion observado en espect. de masa
	41	1,61 minutos (Protocolo A)	1642 [M+2H]
	49	0,89 minutos (Protocolo B)	1714 [M+2H]
	56	0,95 minutos (Protocolo B)	1618 [M+2H]
	62	2,01 min (Protocolo A)	1026 [M+2H]
	76	0,75 min (Protocolo B)	1471,1 (M+2H)+
	77	0,75 min (Protocolo B)	1456,9 (M+2H)+
	100	0,92 min (Protocolo B)	1374,8 (M+2H)+

Tabla 4: Los siguientes conjuntos de enlazador/carga útil o enlazador/carga útil de referencia se preparan utilizando el procedimiento descrito anteriormente para la preparación de análogos de enlazador/carga útil que se muestran en la **Tabla 3**.

Estructuras de enlazador para la Tabla 4



y



5 en donde

P representa el punto de unión a dicha carga útil, R⁷ es independientemente H o -alquilo C₁-C₂₀,

R⁸ es -alquilo C₁-C₂₀, -arilo C₆-C₁₄ o -heteroarilo C₆-C₁₄,

n = 0-20, y

m = 0-20.

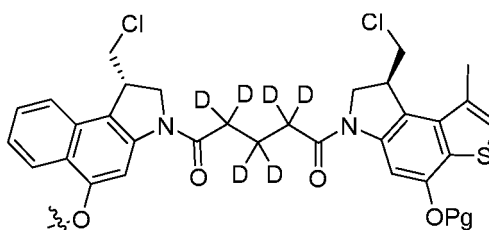
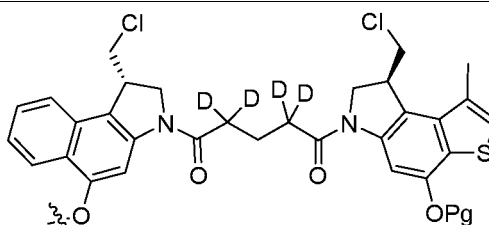
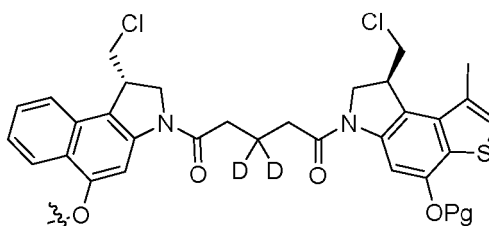
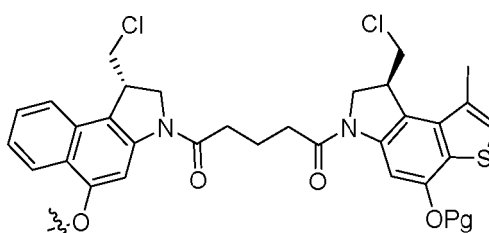
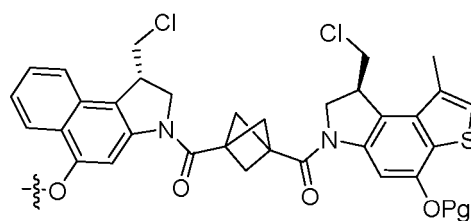
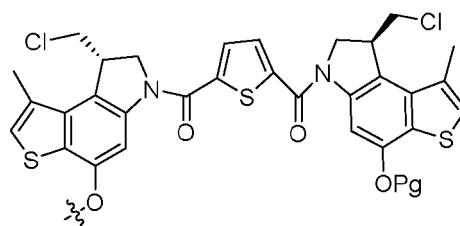
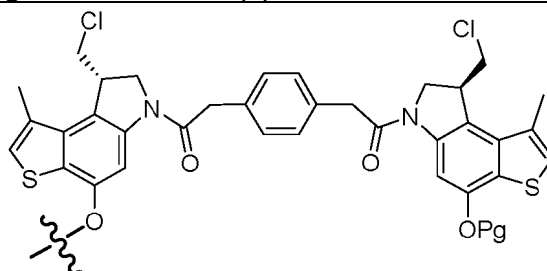
10

Tabla 4. Enlazador/carga útil adicional o enlazador/car útil de referencia

Se indican los puntos de unión de las estructuras de enlace anteriores y se encuentran en el fenol de la carga útil: Carga útil o estructura de carga útil de referencia (P)	

(continuación)

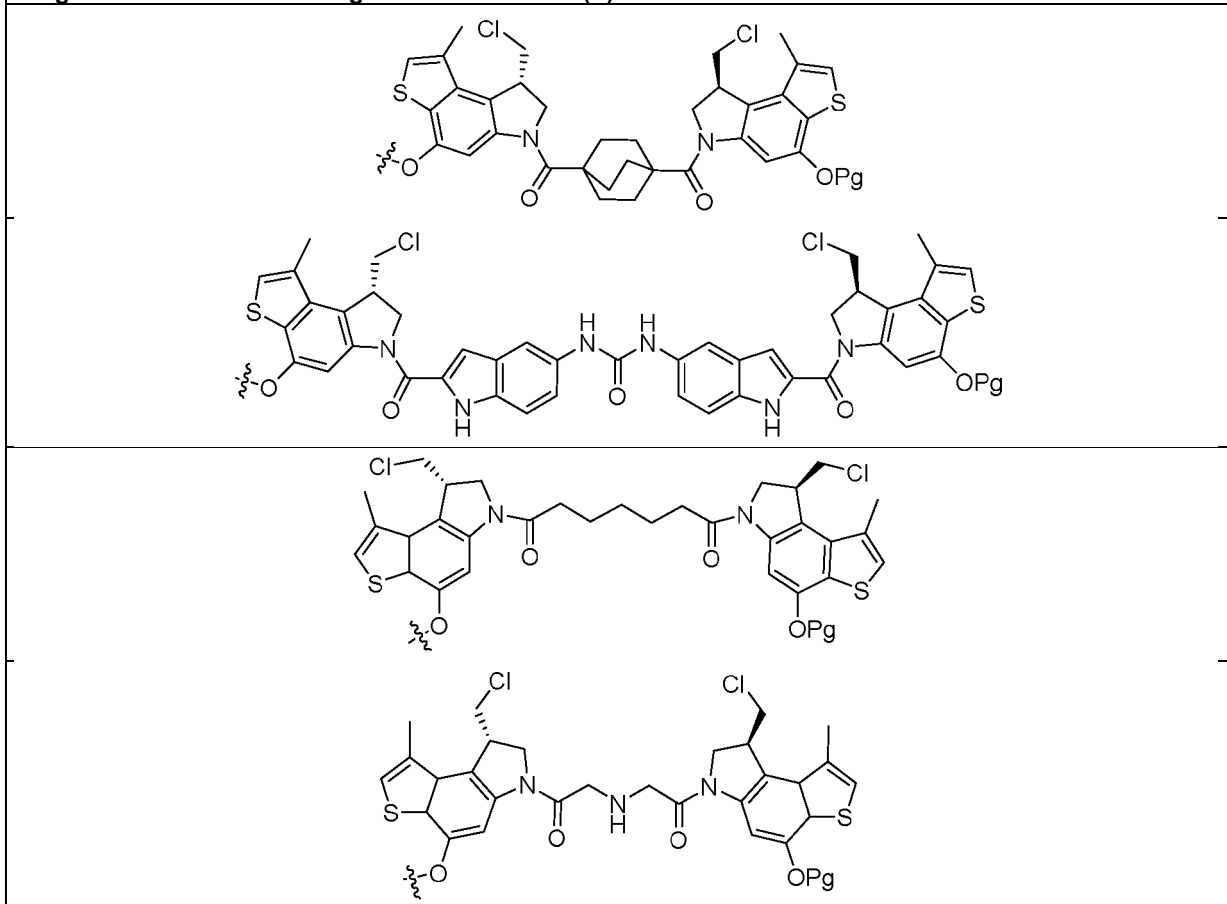
Se indican los puntos de unión de las estructuras de enlace anteriores y se encuentran en el fenol de la carga útil:

Carga útil o estructura de carga útil de referencia (P)

(continuación)

Se indican los puntos de unión de las estructuras de enlace anteriores y se encuentran en el fenol de la carga útil:

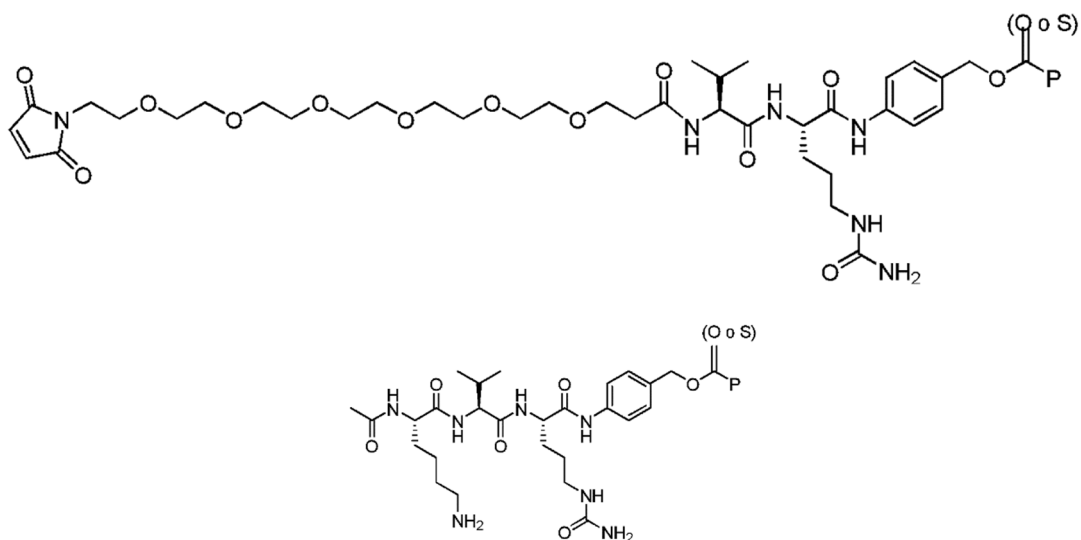
Carga útil o estructura de carga útil de referencia (P)

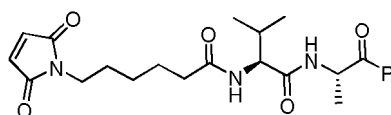
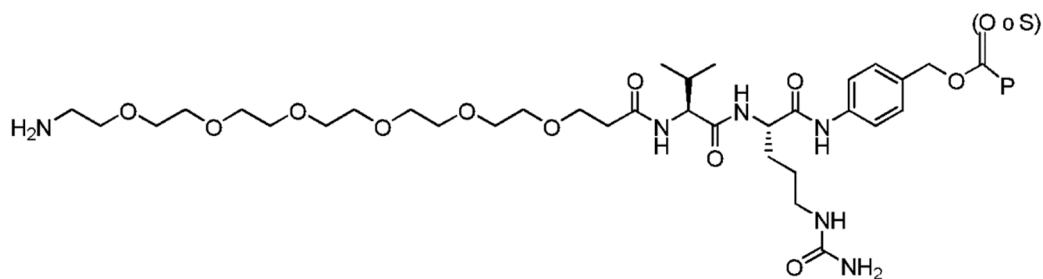


En la Tabla 4, Pg es H, acilo, fosfato PO_3H_2 , un carbohidrato, un aminoácido o un péptido (en particular un péptido que se escinde por proteasas, tales como catepsinas y metaloproteinasas de matriz).

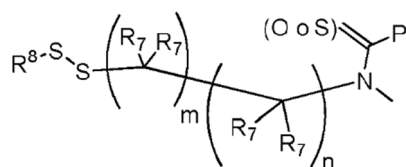
Estructuras de enlazador para la Tabla 5

de:





, y



5

en donde

P representa el punto de unión a dicha carga útil, R^7 es independientemente H o -alquilo C_1 - C_{20} ,

R^8 es -alquilo C_1 - C_{20} , -arilo C_6 - C_{14} o -heteroarilo C_6 - C_{14} ,

$n = 0$ - 20 , y

10

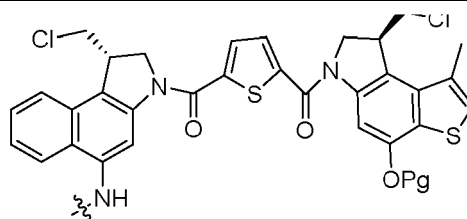
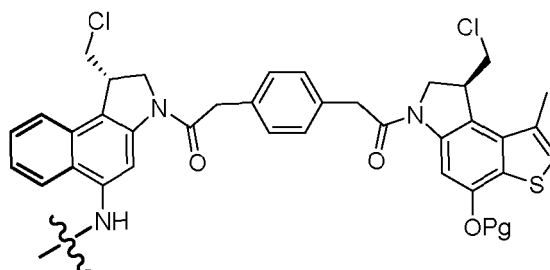
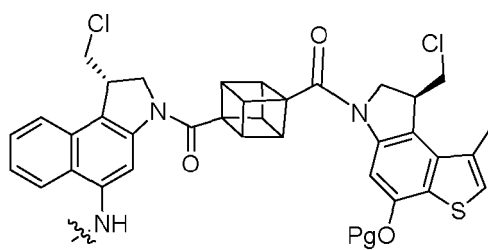
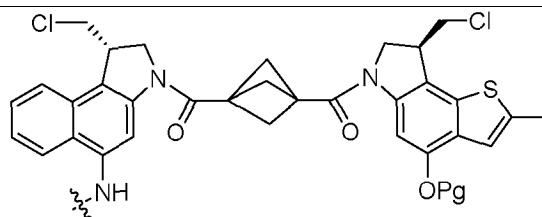
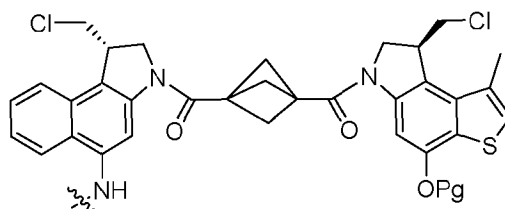
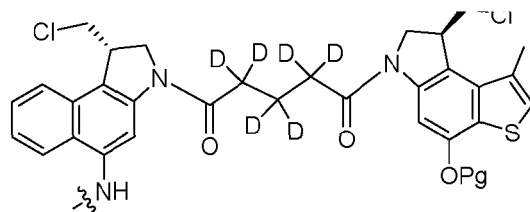
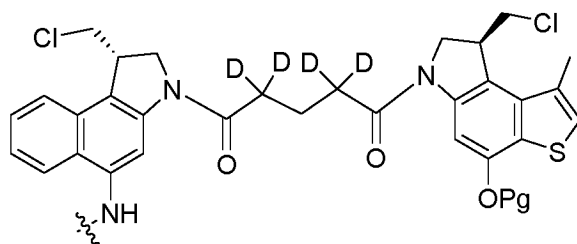
$m = 0$ - 20 .

Tabla 5. Enlazador-carga útil adicional o enlazador-carga útil de referencia

Los puntos de unión de las estructuras enlazadoras anteriores se encuentran en la función de anilina N:	
Carga útil o estructura de carga útil de referencia (P)	

(continuación)

Los puntos de unión de las estructuras enlazadoras anteriores se encuentran en la función de anilina N:

Carga útil o estructura de carga útil de referencia (P)

(continuación)

Los puntos de unión de las estructuras enlazadoras anteriores se encuentran en la función de anilina N:	
Carga útil o estructura de carga útil de referencia (P)	

En la Tabla 5, Pg es H, acilo, fosfato PO_3H , un carbohidrato, un aminoácido o un péptido (en particular un péptido que se escinde por proteasas, tales como catepsinas y metaloproteinasas de matriz).

Procedimientos experimentales para la evaluación biológica de cargas útiles y conjugados de anticuerpo-fármaco

5 Líneas celulares para ensayos de viabilidad de carga útil

Se obtuvieron líneas celulares de cáncer de ATCC (Manassas, VA). N87 (carcinoma gástrico humano derivado del sitio metastásico del hígado). HL60 (leucemia) y MDA-MB-361 DYT2 (carcinoma de mama humano MDA-MB-361) se cultivaron en medio RPMI 1640. Todos los medios se suplementaron con suero bovino fetal al 10 %, piruvato de sodio al 1 % y L-glutamina al 1 % (Invitrogen, Grand Island, NY). Las células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC, por sus siglas en inglés) se obtuvieron de Lonza (Allendale, NJ) y se mantuvieron en medio EGM2 suplementado con EGM-2 SingleQuots (N.º de Lonza CC-4176). Todas las células se mantuvieron en una incubadora humidificada (37 °C, CO_2 al 5 %).

Procedimiento de ensayo de citotoxicidad para cargas útiles

Las células en 100 μl de medio se cultivaron en una placa de 96 pocillos. Las líneas celulares de cáncer se trataron con los compuestos indicados mediante la adición de 50 μl de solución madre a 3X por duplicado a 10 concentraciones. Las células se incubaron con los compuestos durante cuatro días, luego se añadieron a las células 30 μl de solución CellTiter® 96 Aqueous One MTS (N.º de cat. de Promega G3582), se incubaron 1,5 horas a 37 °C, después se midió la absorbancia a 490 nm en un lector de placas Victor (Perkin Elmer, Waltham, MA). La viabilidad celular relativa se determinó como un porcentaje de los pocillos de control no tratados. Los valores de CI_{50} se calcularon utilizando el modelo logístico de cuatro parámetros N.º 203 con XLfit v4.2 (IDBS, Guildford, Surry, Reino Unido).

Procedimiento de ensayo de citotoxicidad para CAF de anti-IL13R α 2

Líneas celulares utilizadas: A375 (melanoma), PC3MM2 (próstata), PC3 (próstata)

Las células se sembraron en una placa de 96 pocillos durante la noche antes de exponerlas a concentraciones crecientes de CAF de anti-IL13R α 2 o de CAF de control. Después de cuatro días, se evaluó la viabilidad de cada cultivo frente a las células de control. Se calcularon los valores de CI₅₀ por regresión logística no lineal.

Procedimiento de ensayos de citotoxicidad para CAF de anti-CD33

- 5 Las líneas celulares de LMA humana (HL60, NB4, HEL92.1.7 y Raji) se obtuvieron de la American Type Culture Collection (Manassas, VA). Las células se cultivaron en medio RPMI, suplementado con FBS al 10 %, mezcla de Pen/Estrep y L-glutamina al 1 %, piruvato de sodio 1 mM, HEPES 10 mM y glucosa al 0,27 % (Life Technology, Carlsbad, CA). Se analizaron las líneas celulares para determinar sus niveles de actividad endógena de glucoproteína P, la proteína de resistencia a múltiples fármacos y la proteína de resistencia al cáncer de mama se determinaron utilizando un kit comercial de citometría de flujo (eFLUXX-ID; ENZO Life Sciences, Plymouth Meeting, PA).

- 10 Para ensayos de citotoxicidad, las células se sembraron en placas opacas de 96 pocillos (Corning) y se trataron con concentraciones variables de compuestos durante 4 días. La viabilidad se determinó utilizando un kit de ensayo de viabilidad de células luminiscentes CellTiter Glo (Promega, Madison, WI) y se midió con un lector de placas Victor X3 (Perkin Elmer Waltham, MA). Los datos se normalizaron al grupo de control (DMSO o PBS). Los valores de CI₅₀ se definieron como la concentración que causa una inhibición del crecimiento del 50 %. Los valores de CI₅₀ se calcularon utilizando una regresión logística no lineal, modelo n.º 203 con XL fit v4.2 (IDBS, Guildford, Surrey, Reino Unido). Todos los puntos experimentales se configuraron en dos pocillos replicados y se realizaron de forma independiente por duplicado. Ensayos de citotoxicidad para CAF de anti-Trastuzumab

- 20 Las células que expresan la diana N87 (cáncer gástrico), MDA-MB-361-DYT2 (cáncer de mama) las que no la expresan (HT-29) se colocaron en placas de cultivo celular de 96 pocillos durante 24 horas antes del tratamiento. Las células se trataron con conjugados de anticuerpo-fármaco diluidos 3 veces de forma seriada. La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo CellTiter 96® AQ-ueous One Solution Cell Proliferation MTS (Promega, Madison WI) 96 horas después del tratamiento. La viabilidad celular relativa se determinó como porcentaje del control no tratado. Los valores de CI₅₀ se calcularon utilizando un modelo logístico de cuatro parámetros N.º 203 con XLfit v4. 2 (IDBS, Guildford, Surrey, Reino Unido).

Los resultados de citotoxicidad de las cargas útiles, las cargas útiles de referencia y los CAF y los CAF de referencia se muestran en las Tablas 6 y 10

Tabla 6: Potencias de carga útil libre del ejemplo:

ID del compuesto	N87 [nM]	HL60 [nM]	DYT2 [nM]
24	0,024	<0,005	0,171
7	0,022	<0,005	0,185
26	0,263	0,014	1,670
12	2,258	0,180	5,077
17	1,296	0,084	6,062
25	41,600	NA	>100
60	0,122	0,009	0,079
61	13,646	0,806	28,587
57	11,020	0,873	37,588
87	0,036	0,349	0,002
88	0,041	0,41	0,004
89	0,041	0,302	0,002

Ejemplificación de conjugados de anticuerpo-fármaco

- 30 **Procedimiento D: Procedimiento general para la conjugación de anticuerpos con enlazador-carga útil a través de disulfuros internos**

- Se redujo una solución de anticuerpo terapéutico en solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (PBS, Lonza pH 7,4) mediante la adición de 3,0-3,5 equivalentes de clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP, solución de 5 mM en PBS). La reacción se incubó a 37 °C durante 1-2 horas y luego se dejó enfriar a temperatura ambiente. La conjugación se realizó mediante la adición de 7 equivalentes de enlazador-carga útil [solución de 10 mM en N, N-

dimetilacetamida (DMA)]. Se añadió DMA adicional a la mezcla de reacción para lograr un 15 % (v/v) de componente de disolvente orgánico total en la mezcla de reacción final. La reacción se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de 1 hora a temperatura ambiente, a la reacción cruda se le intercambió el tampón con PBS mediante columnas de desalación GE Sephadex o el exceso de enlazador-carga útil se inactivó mediante la adición de 10 equivalentes de cisteína (solución de 20 mM en PBS). En cualquier caso, el material bruto se purificó luego por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC, Protocolo C). Las fracciones monoméricas se agruparon y se concentraron si fuera necesario para dar el CAF.

Procedimiento E: Conjugación específica del sitio del enlazador-carga útil con un anticuerpo trastuzumab que contiene restos de cisteína diseñados genéticamente

Se preparó una solución de anticuerpo terapéutico que contenía un resto de cisteína diseñado genéticamente (numeración Kabat, véase el documento WO2013093809) en tampón fosfato 50 mM, a pH 7,4. Se añadió PBS, EDTA (solución madre de 0,5 M) y TCEP (solución madre de 0,5 M) de modo que la concentración final de proteína fue de ~10 mg/ml, la concentración final de EDTA fue de ~20 mM, y la concentración final de TCEP fue de aproximadamente ~6,6 mM (100 eq. molares). Se permitió que la reacción permaneciera a temperatura ambiente durante 2-48 h y luego se intercambió el tampón en PBS usando columnas GE PD-10 Sephadex G25 según las instrucciones del fabricante. Los procedimientos alternativos tales como la diafiltración o la diálisis también son útiles en circunstancias particulares. La solución resultante se trató con aproximadamente 50 equivalentes de deshidroascorbato (solución madre de 50 mM en EtOH/agua a 1:1). El anticuerpo se dejó en reposo a 4 °C durante la noche y posteriormente se intercambió el tampón en PBS usando columnas GE PD-10 Sephadex G25 según las instrucciones del fabricante. De nuevo, los procedimientos alternativos tales como la diafiltración o la diálisis también son útiles en circunstancias particulares.

La conjugación con el anticuerpo así preparado se realizó mediante la adición de 10 equivalentes de enlazador-carga útil [solución de 10 mM en N,N-dimetilacetamida (DMA)]. Se añadió DMA adicional a la mezcla de reacción para lograr un 15 % (v/v) de componente de disolvente orgánico total en la mezcla de reacción final. En algunos casos, se añadió PBS adicional para lograr la concentración final de anticuerpos totales en la reacción de 5-10 mg/ml. Después de 1-2 horas a temperatura ambiente, a la mezcla de reacción se le intercambió el tampón en PBS (según lo anterior) y se purificó por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC, Protocolo D). Las fracciones monoméricas se agruparon y se concentraron si fuera necesario para dar el CAF. En algunos casos, el CAF se incubó posteriormente después de la purificación por SEC con 0,5-1,0 g de adsorbente Bio-Beads SM-2 (Bio-Rad) a 23-37 °C durante 4-18 h, se filtró y luego se concentró si fuese necesario.

Procedimiento F: Conjugación mediada por enzimas con anticuerpos que llevan restos reactivos de glutamina:

El anticuerpo terapéutico que lleva restos de glutamina reactivos a la enzima transglutaminasa se dializó en agua estéril (Lonza). La conjugación mediada por transglutaminasa se llevó a cabo mezclando 5,0-15 mg/ml de anticuerpo que contiene glutamina reactiva con transglutaminasa en agua con fosfato de potasio 30 mM a pH 7,4 concentrado de medio de disolución DILUT-IT (J.T. Baker), cloruro de sodio 150 mM (NaCl), exceso molar de 15,0-20,0 veces de enlazador aminoalquil que transporta carga útil (solución de 10-30 mM en DMSO) y 30-60 mg/ml de polvo de enzima transglutaminasa (Ajinomoto Activa TI). Además, se añadió DMSO a la mezcla de reacción para lograr un 5-10 % (v/v) de componente de disolvente orgánico total en la mezcla de reacción final. En algunos casos, se añadió agua adicional para lograr la concentración final de anticuerpos totales en la reacción de 5-10 mg/ml. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 5-6 horas. A continuación, se añadieron otros 30-60 mg/ml de transglutaminasa sólida y la mezcla se incubó adicionalmente a temperatura ambiente durante 18 horas adicionales. Después de toda la noche, a la reacción cruda se le intercambió el tampón con solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (PBS, a pH7,4, Lonza) utilizando columnas de intercambio de tampones Sephadex de GE Healthcare según las instrucciones del fabricante. El material crudo se purificó por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC, Protocolo D) o por cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC, Protocolo G). Después de la purificación, las fracciones monoméricas se agruparon y se concentraron si fuera necesario para dar el CAF. En ejemplos en los que el CAF se purificó mediante HIC, a las fracciones agrupadas se les intercambió el tampón con solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (PBS, a pH7,4, Lonza) utilizando columnas de intercambio de tampones Sephadex de GE Healthcare según las instrucciones del fabricante. En algunos casos, el CAF se incubó posteriormente después de la purificación con 0,5-1,0 g de adsorbente Bio-Beads SM-2 (Bio-Rad) a 23-37 °C durante 4-18 h, se filtró y luego se concentró si fuera necesario.

El ADC se caracterizó mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) y cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) para la pureza, y se hizo una cromatografía líquida de espectrometría de masas en tándem de ionización por electroaspersión (LC-ESI MS) para calcular la proporción de fármaco-anticuerpo (DAR, carga).

Protocolo C: Columna: Agilent Poroshell 300SB-C8, 75 x 2,1 mm, 2,6 µm; Fase móvil A: Ácido fórmico al 0,1 % en agua (v/v); Fase móvil B: Ácido fórmico al 0,1% en acetonitrilo (v/v); Gradiente: Condiciones iniciales: 20 % de B al 45 % de B durante 4 minutos; Caudal: 1,0 ml/minuto. Temperatura: 60 °C; Detección: 220 nm; MS (+) intervalo de 400-2000Da; Volumen de inyección: 10 µl; Equipo: Agilent 1100 LC, Waters MicromassZQ MS. La desconvolución se realizó utilizando MaxEnt1.

Protocolo D: Columna: GE Superdex 200 (10/300 GL); Fase móvil: Solución salina tamponada con fosfato (PBS,

1X, a pH 7,4); Isocrático; Caudal: 1,0 ml/minuto. Temperatura: temperatura ambiente; Equipo: GE Akta Explorer.

Protocolo E: Columna = Waters BEH300-C4, 2,1 x 100 mm (P/N = 186004496); Equipo = Acquity UPLC con un detector de especificación de masa SQD2; Caudal = 0,7 ml/min; Temperatura = 80 °C; Tampón A = agua + ácido fórmico al 0,1 %; Tampón B = acetonitrilo + ácido fórmico al 0,1 %. El gradiente va del 3 % de B al 95 % de B durante 2 minutos, se mantiene al 95 % de B durante 0,75 min, y luego se reequilibra al 3 % de B. La muestra se reduce con TCEP o DTT inmediatamente antes de la inyección. El eluato se controla por LCMS (400-2000 daltons) y el pico de proteína se desconvoluciona usando MaxEnt1. El DAR se documenta como una carga promedio en peso como se ha descrito anteriormente.

Protocolo F: Columna: TSKGel Butyl NPR, 4,6 mm x 3,5 cm (P/N = S0557-835); Tampón A = sulfato de amonio 1,5 M que contiene fosfato 10 mM, a pH 7; Tampón B = fosfato 10 mM, a pH 7 + alcohol isopropílico al 20 %; Caudal = 0,8 ml/min; Temperatura = ambiente; Gradiente = 0 % de B al 100 % B durante 12 minutos, mantener al 100 % de B durante 2 minutos, luego reequilibrar al 100 % de A; Equipo: Agilent 1100 HPLC.

Protocolo G: Columna: GE HiTrap Butyl HP, 5 ml; Fases móviles: Fosfato de potasio 1 M, Tris-HCl 50 mM, pH7 (tampón A); Tris-HCl 50 mM, pH7 (tampón B); Gradiente de elución: 0-100 % de tampón B sobre 10-20 volúmenes de columna; Caudal: 5,0 ml/minuto. Temperatura: temperatura ambiente; Equipo: GE Akta Explorer.

Tabla 7: Estructura del CAF y CAF de referencia y enlazador-carga útil utilizados para prepararlos

N.º de CAF	Estructura	LP utilizado para síntesis
CAF N.º 1		41
CAF N.º 2		76
CAF N.º 3		77
CAF N.º 4		41
CAF N.º 5		41
CAF N.º 6		41

X = En la tabla anterior, "X" indica el anticuerpo utilizado para la conjugación tal como se indica en la Tabla 5.

Tabla 8: Procedimiento general para la preparación de CAF y CAF de referencia

N.º de CAF	Procedimiento general para la preparación	Anticuerpo usado	Enlazador-Carga útil usada	PM teórico (aumento)
CAF N.º 1	D	IL13R α 2-AB08-v1.0	41	1640
CAF N.º 2	F	Trastuzumab-H16-K222R-hG1	76	1450
CAF N.º 3	F	Trastuzumab-H16-K222R-hG1	77	1436
CAF N.º 4	E	CD33-11A1-v1417-hG1-(C)	41	1640
CAF N.º 5	E	CD33-11A1-v1417-K334C-K392C-hG1-(C334+C392)	41	1640
CAF N.º 6	E	CD33-11A1-v1417-K334C-hG1-(C334)	41	1640

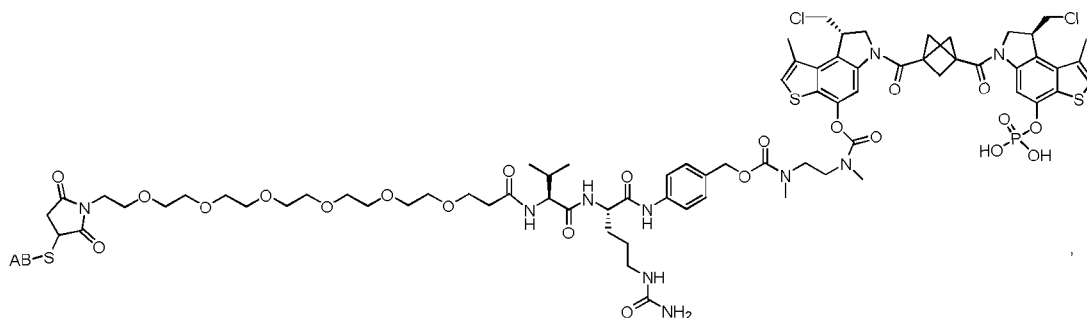
Tabla 9: Procedimiento de purificación y caracterización analítica de CAF y CAF de referencia

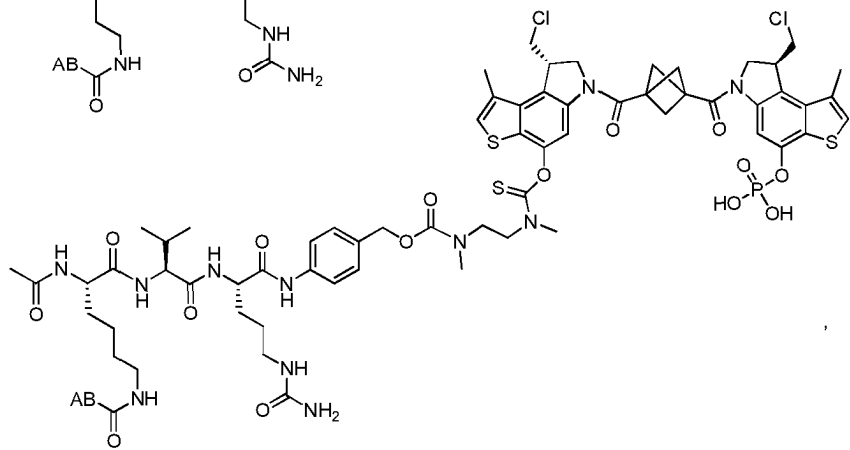
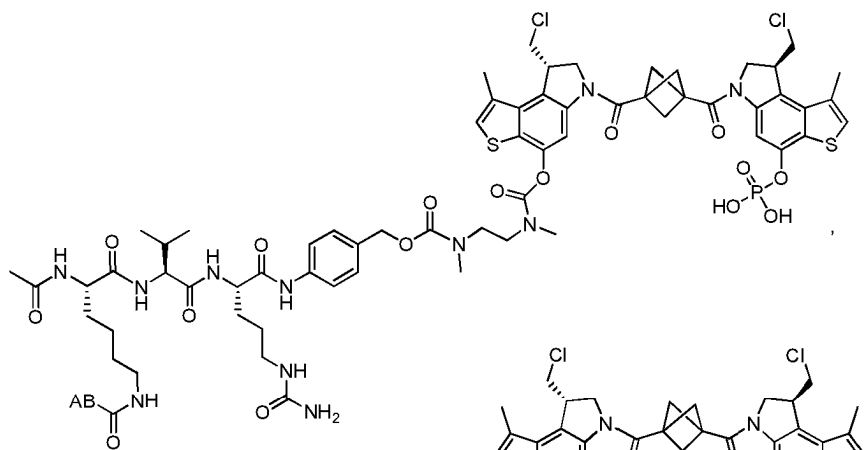
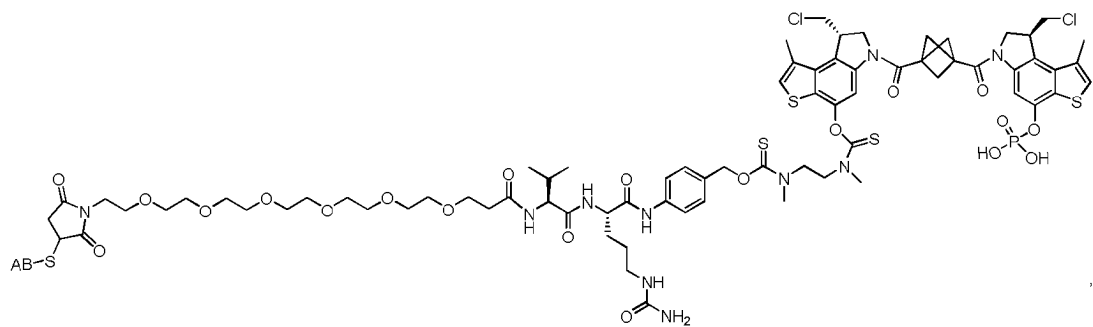
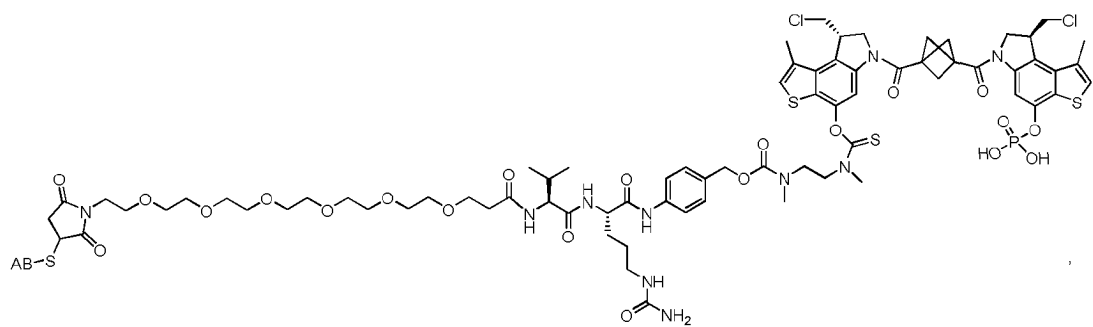
N.º de CAF	Procedimiento de Purificación	Rendimiento aislado	Tiempo de retención de HIC (Procedimiento F)	□ Masa observada para la porción de cadena pesada (HC)	Proporción de fármaco por anticuerpo (DAR) (Procedimiento de LC/MS) (protocolo E)	Proporción de fármaco por anticuerpo (DAR) (Procedimiento de HIC) (Protocolo F)
CAF N.º 1	Protocolo D	18 %	NA	1642	2,1	NA
CAF N.º 2	Protocolo D	36 %	5,43	1450	1,5	1,7
CAF N.º 3	Protocolo D	34 %	5,48	1436	1,8	1,9
CAF N.º 4	Protocolo D	52 %	6,20	1641	2,8	2,6
CAF N.º 5	Protocolo D	72 %	5,34	1639	3,6	3,5
CAF N.º 6	Protocolo D	73 %	5,41	1640	2,0	2,0

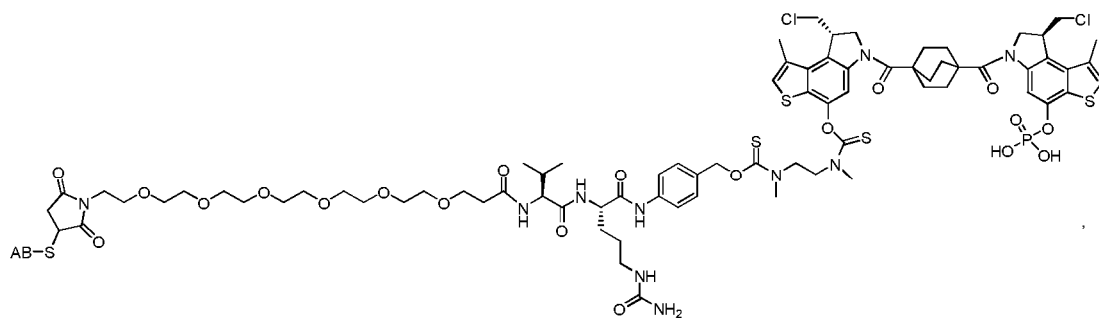
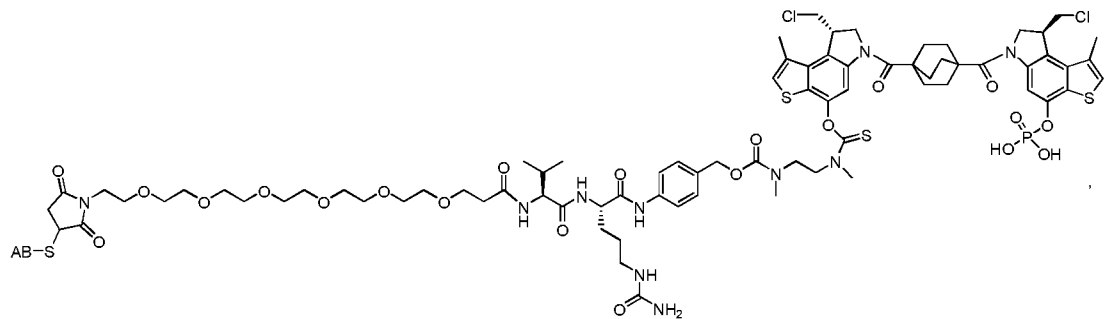
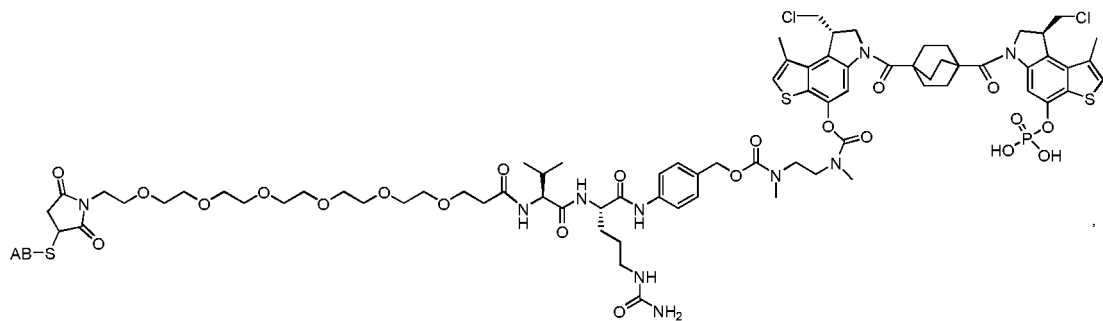
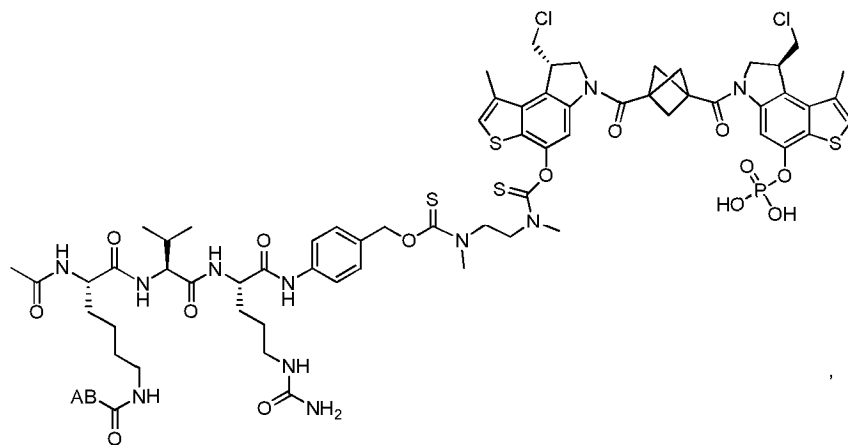
Tabla 10: Datos de citotoxicidad *in vitro* para los CAF N.º 1-6 en líneas celulares de Antígeno + ve y Antígeno -ve

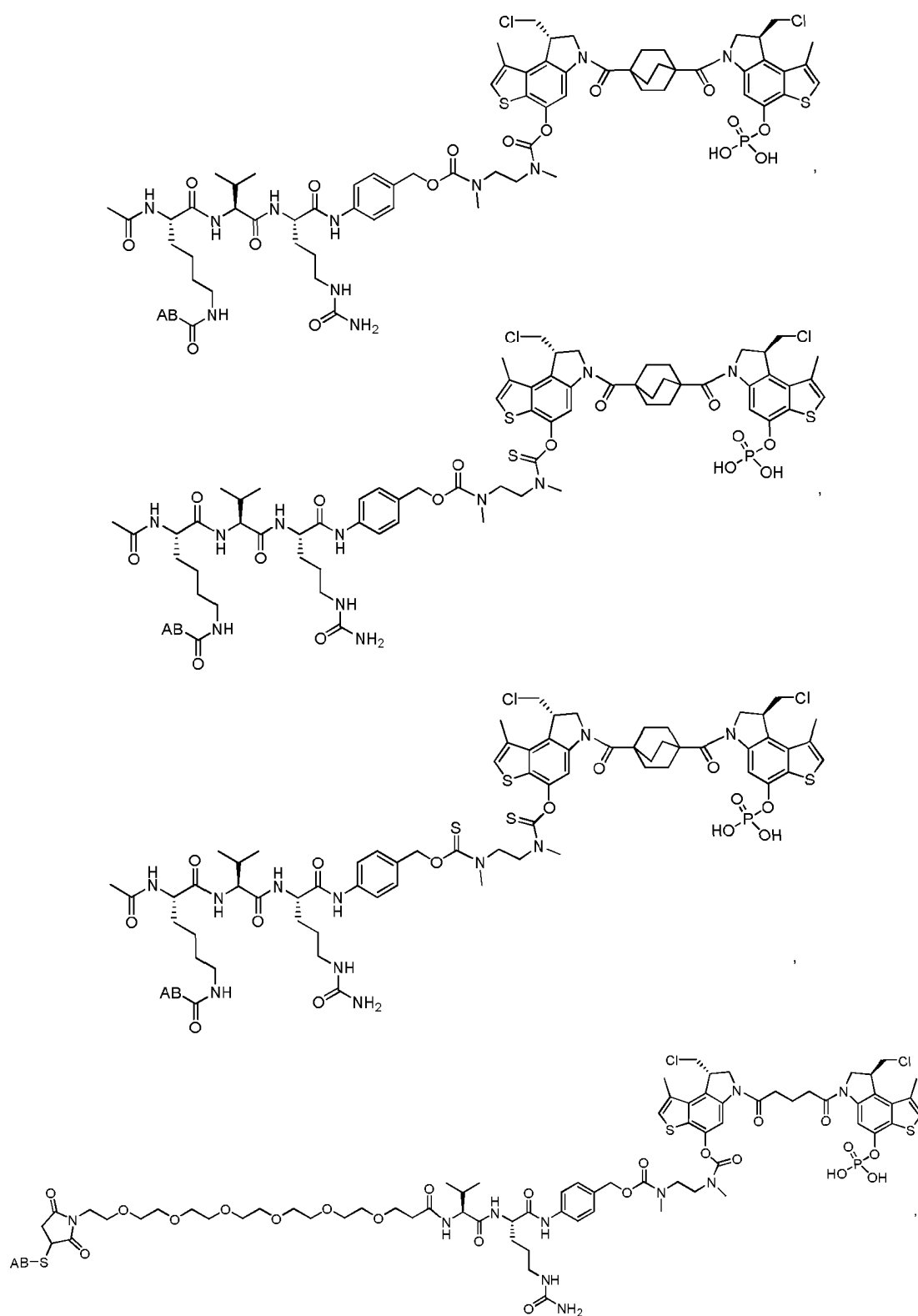
N.º de CAF	N87 (+ve)	MDA -MB-361-DYT2	HT29 (-ve)	A375 (+ve)	PC3MM2 (+ve)	PC3 (-ve)	HL-60 (+ve)	HEL 92.1.7 (+ve)	Raji (-ve)
CAF N.º 1				0,9	0,5	>1000			
CAF N.º 2	0,6	>470	>470						
CAF N.º 3	0,4	>470	>470						
CAF N.º 4							1,7	<0,5	3040,7
CAF N.º 5							1,5	0,6	>10.000
CAF N.º 6							2,1	0,6	>10.000

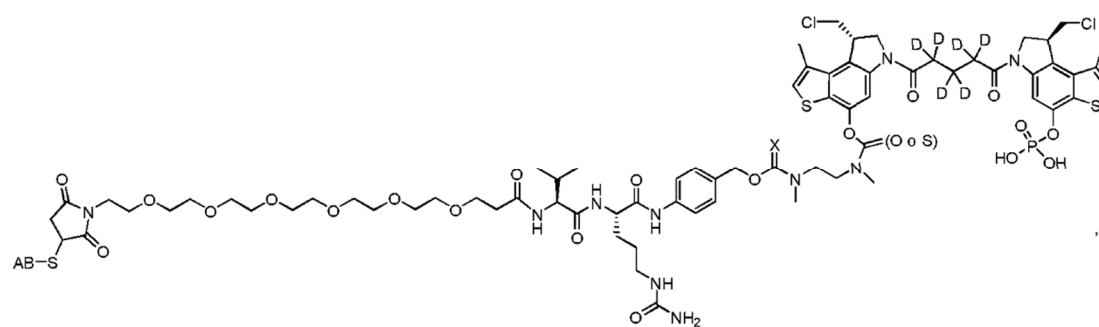
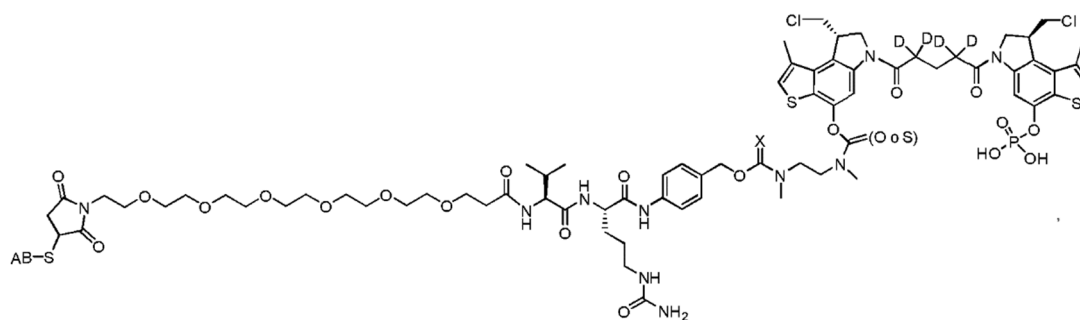
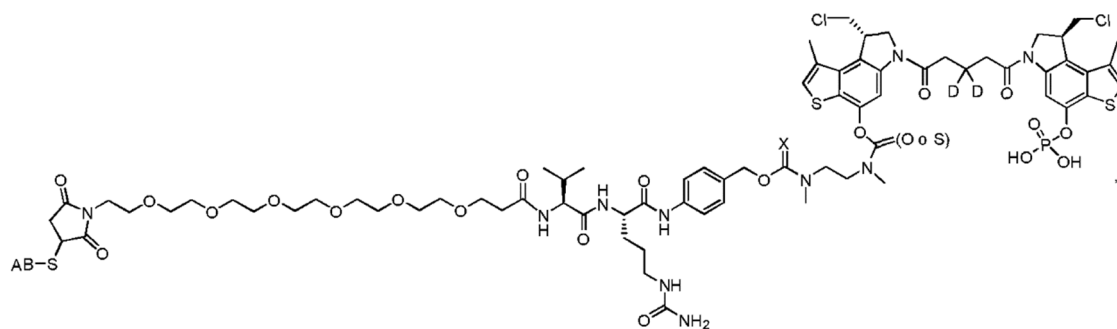
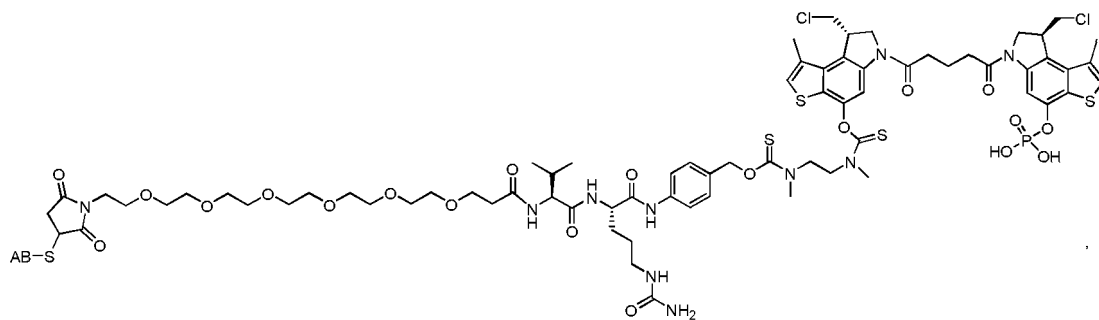
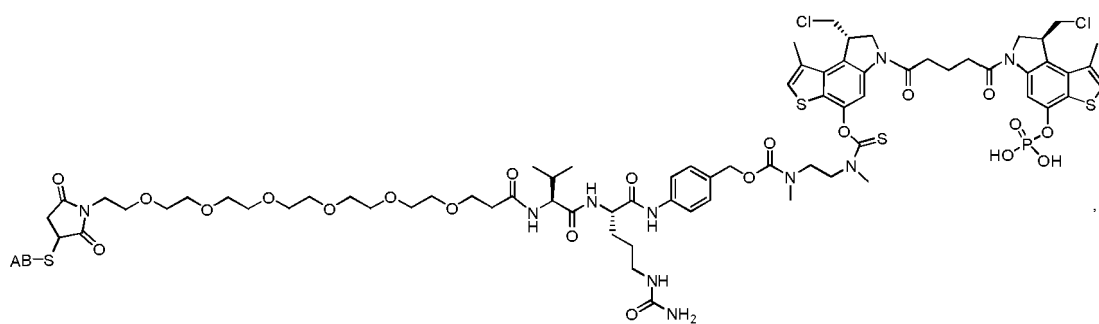
- 5 Se preparan los siguientes CAF y CAF de referencia, incluyendo el enlazador/carga útil que se muestra en las **Tablas 4 y 5** conjugado con anticuerpos de interés utilizando el procedimiento de conjugación apropiado:

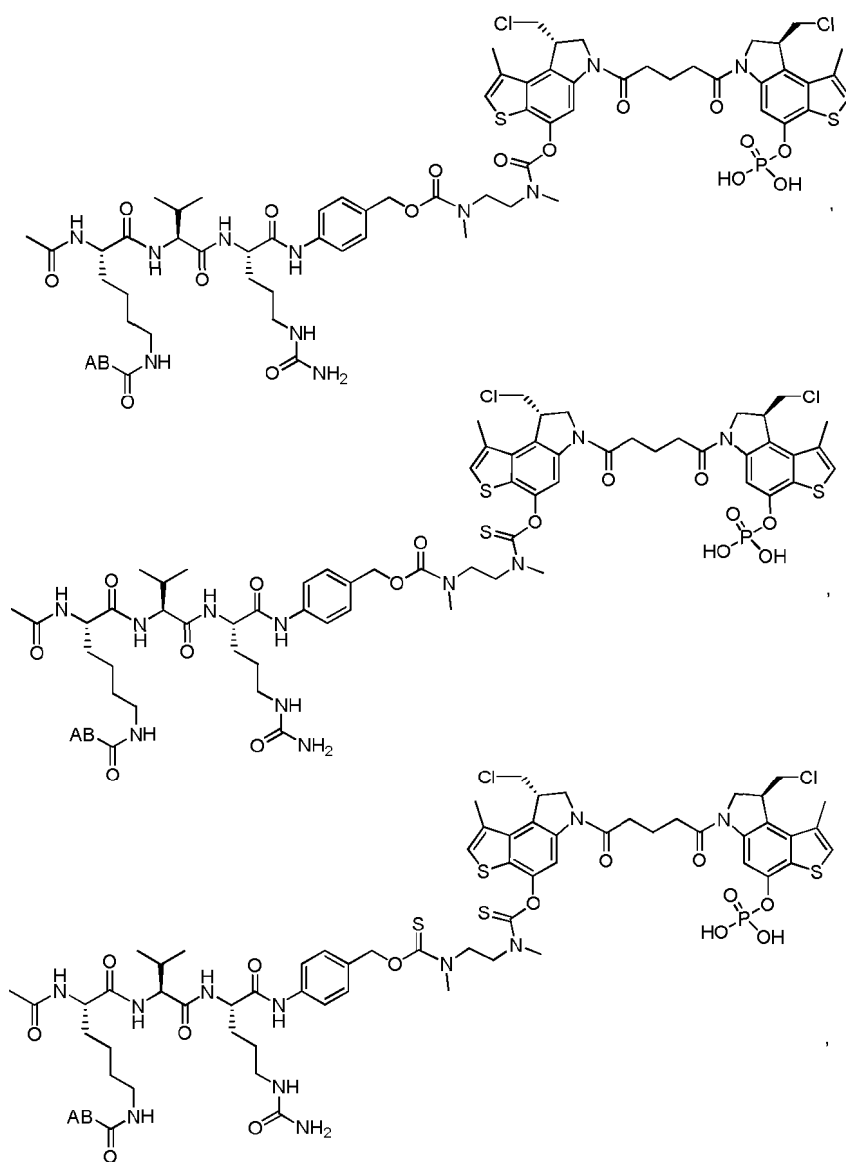


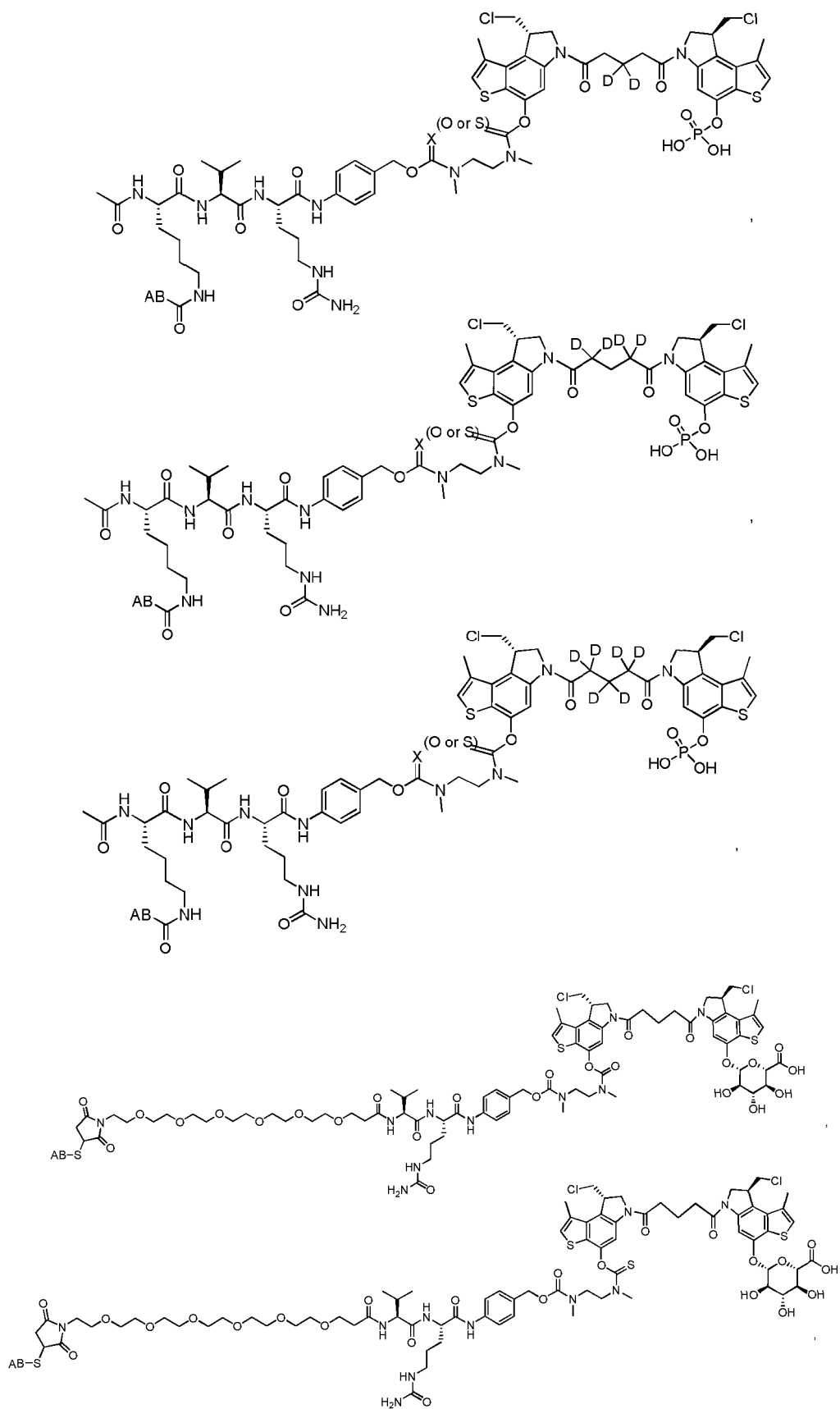


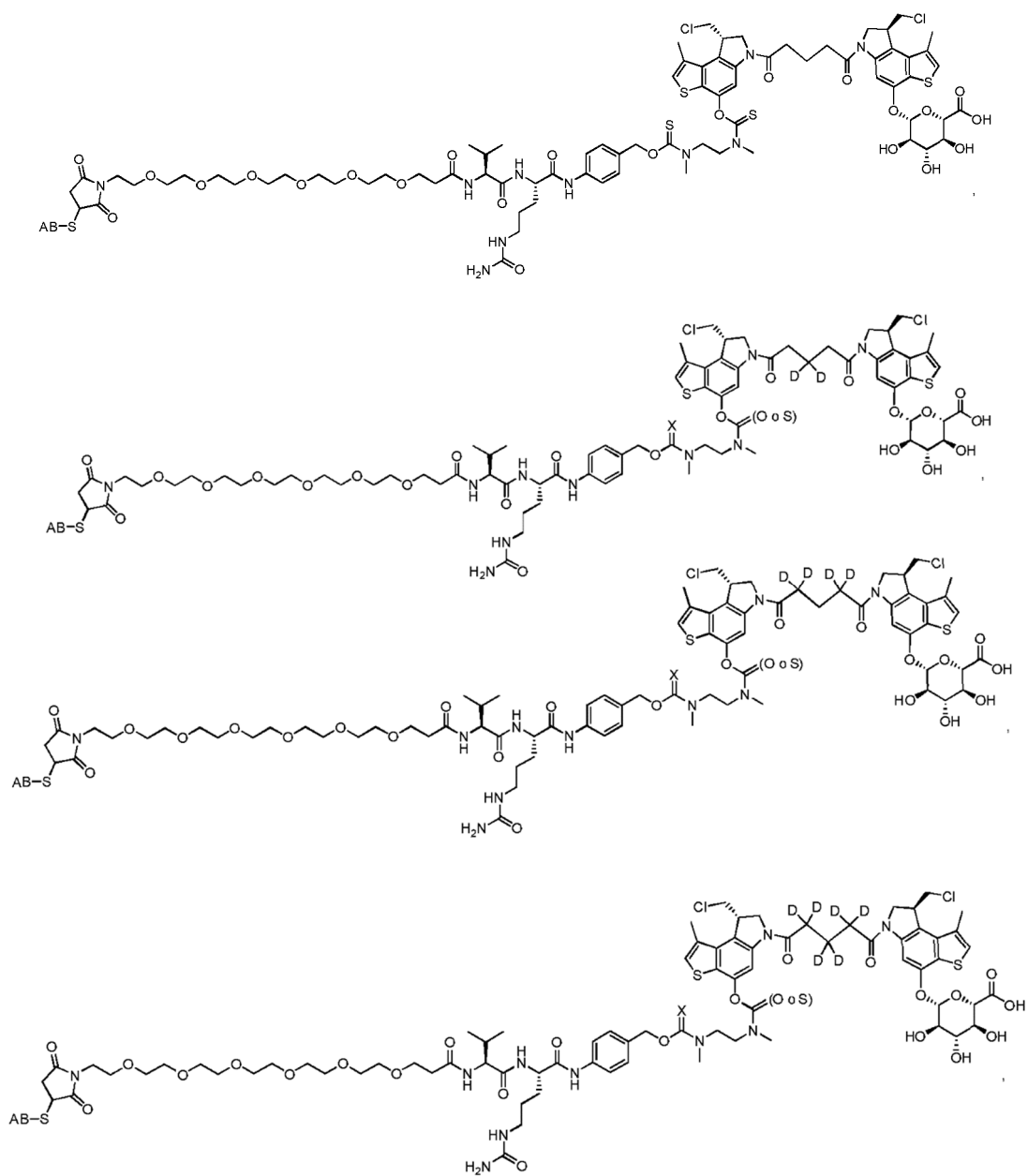


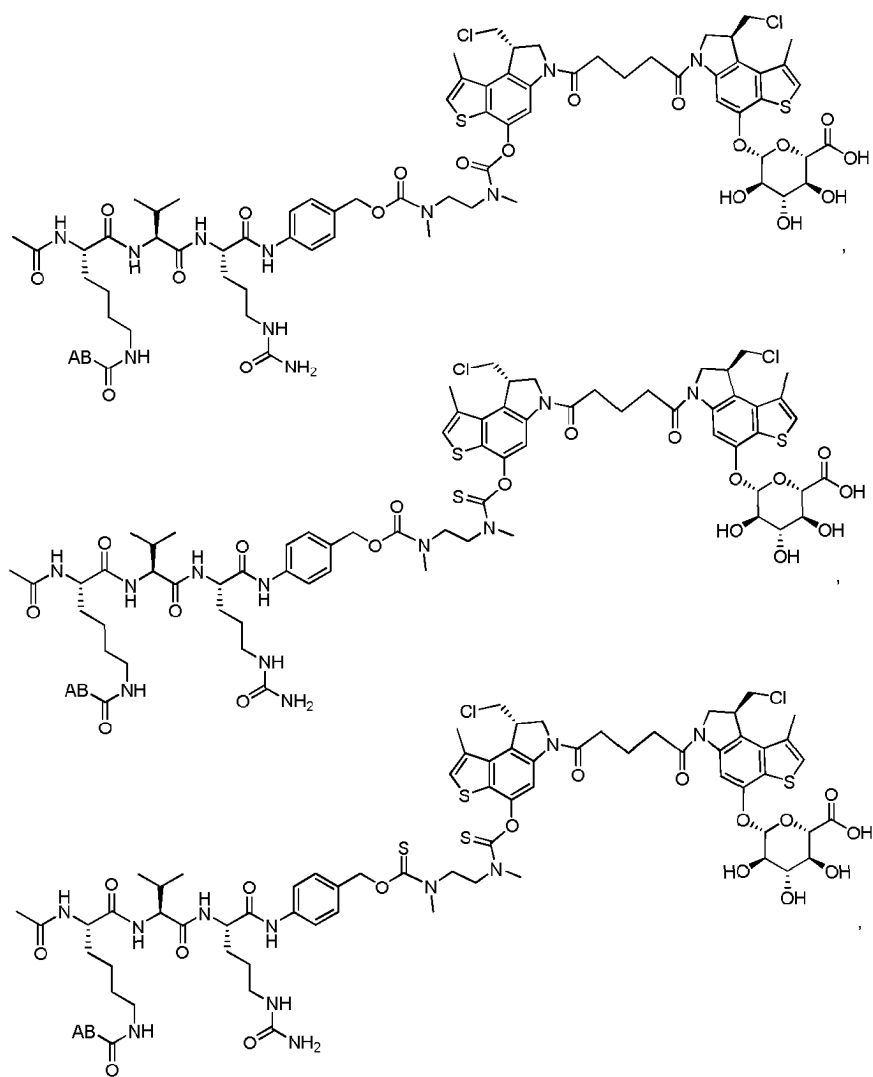


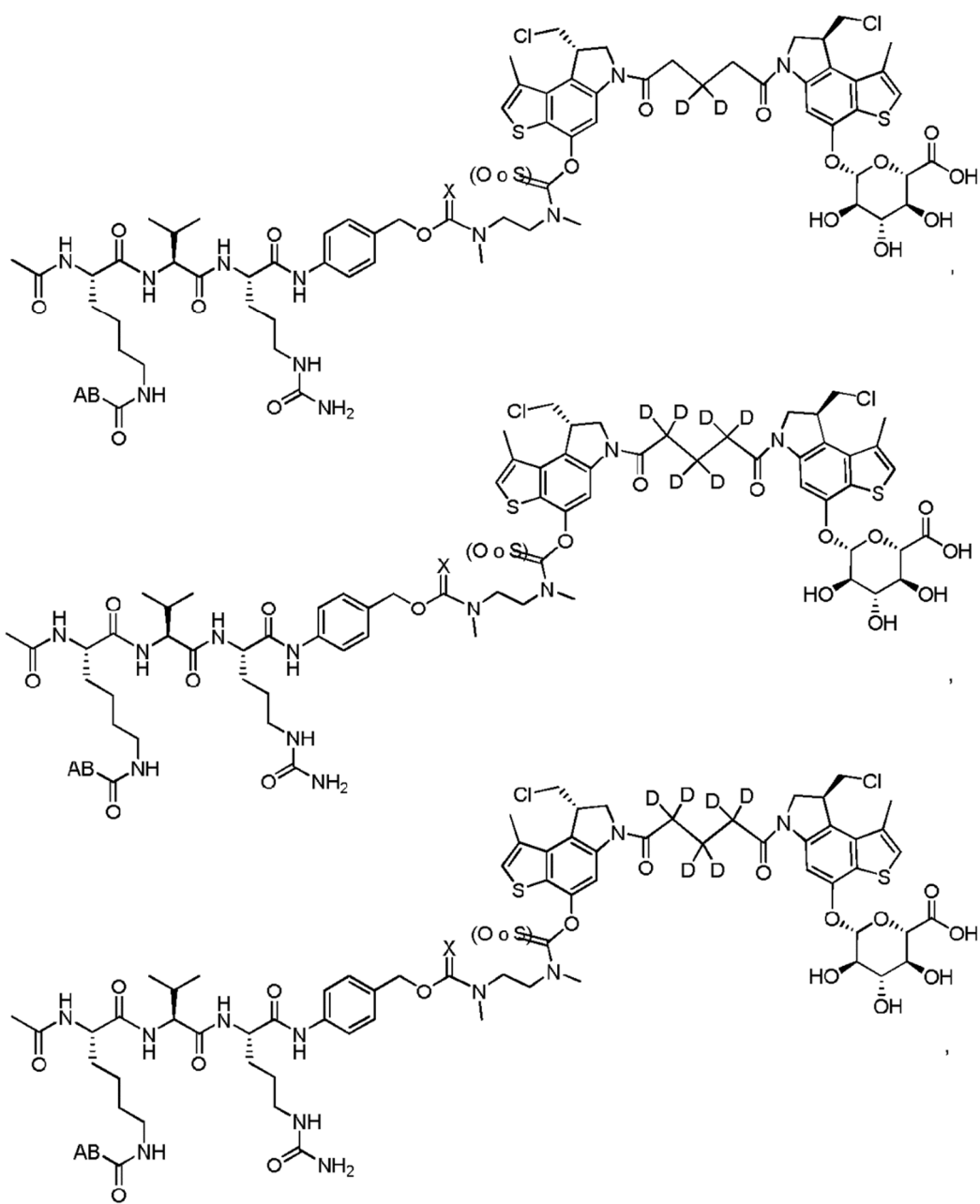


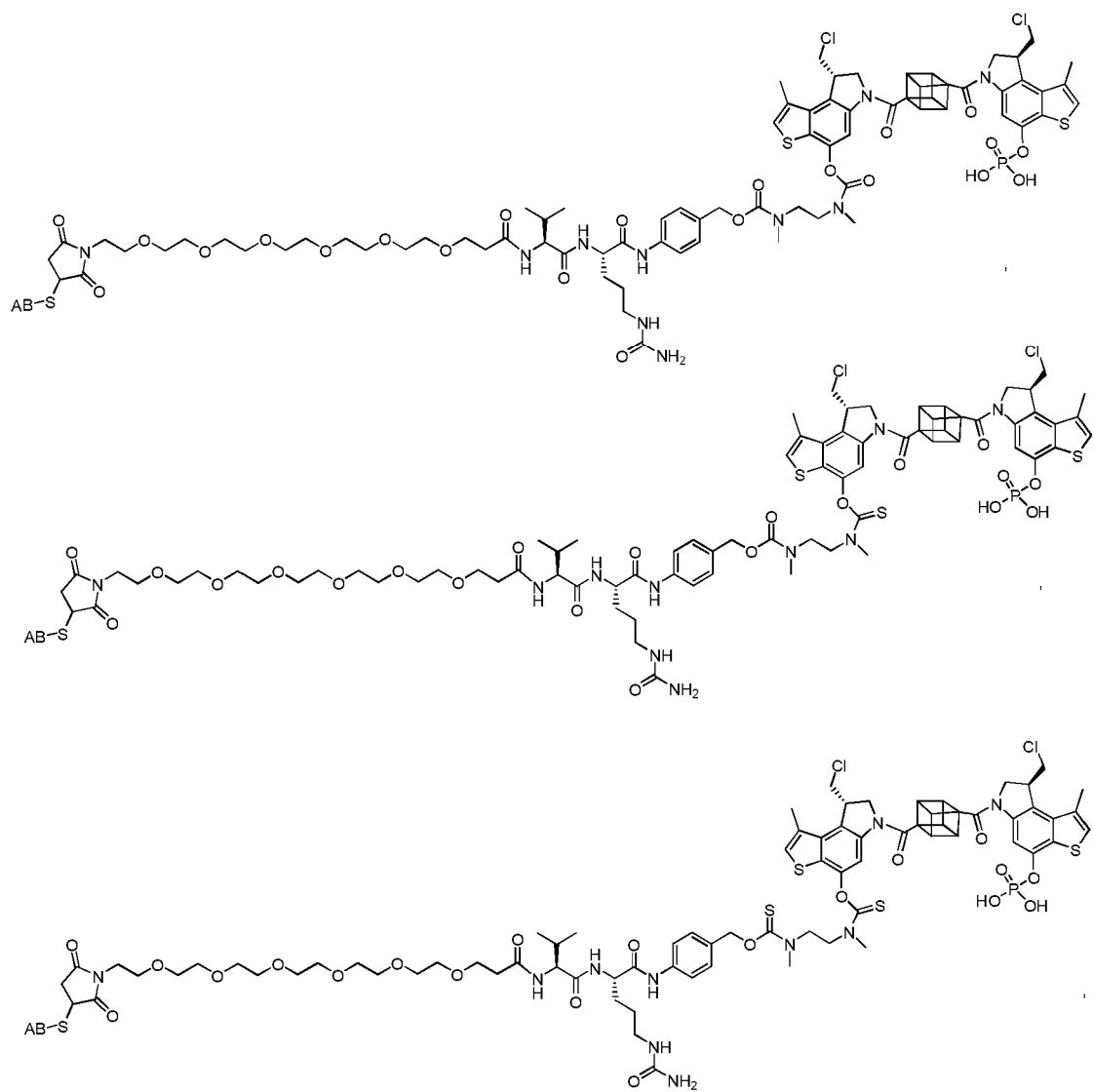


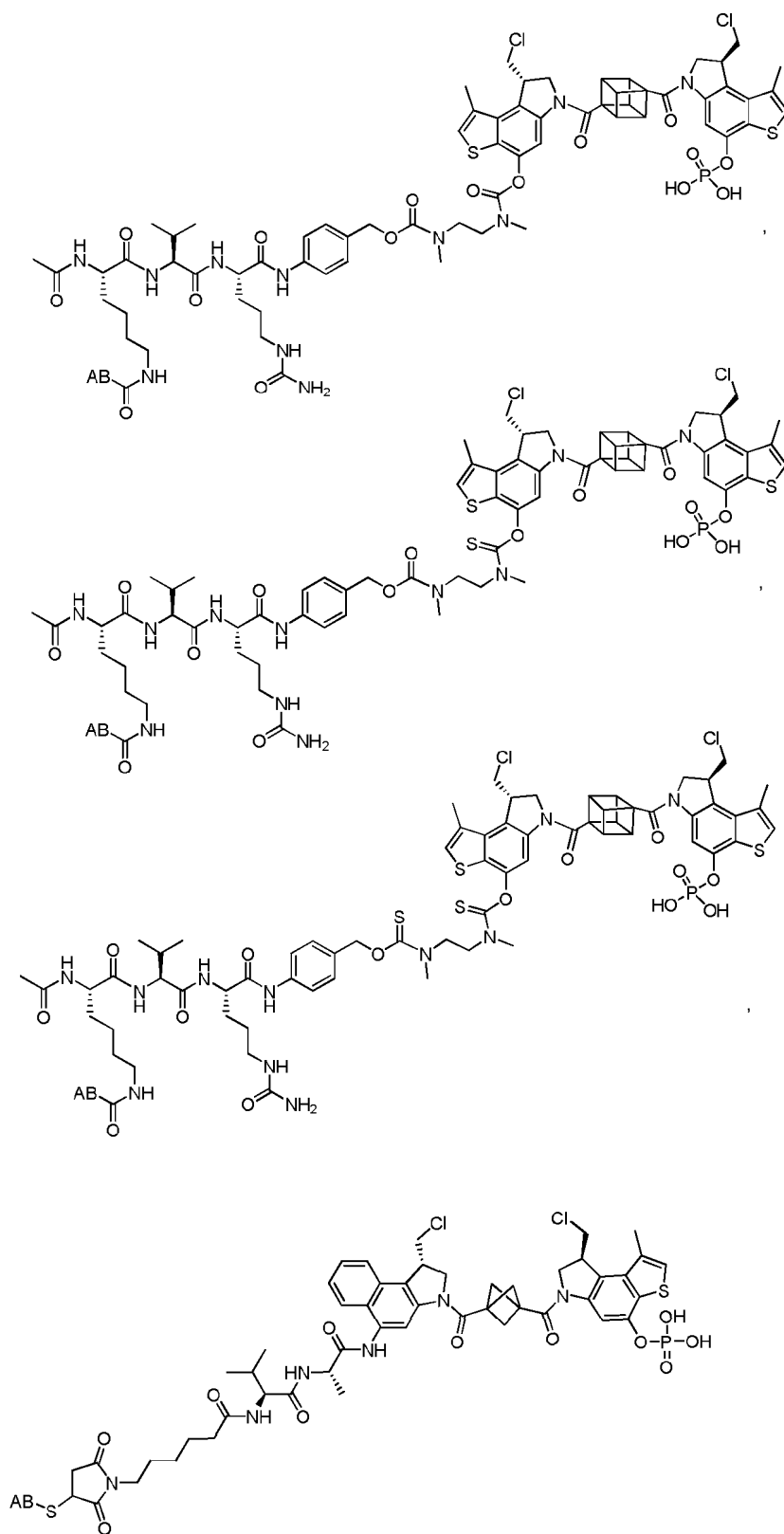




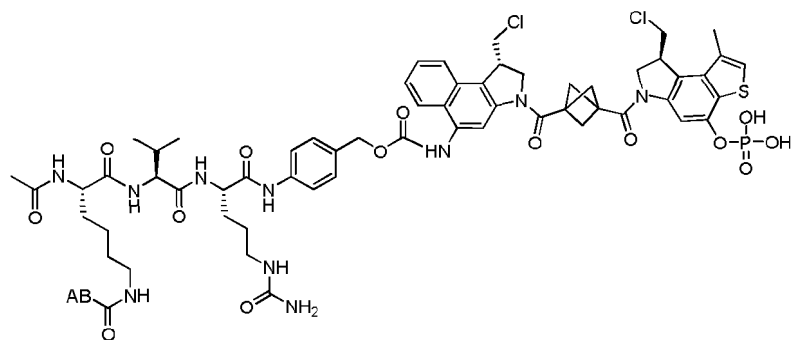






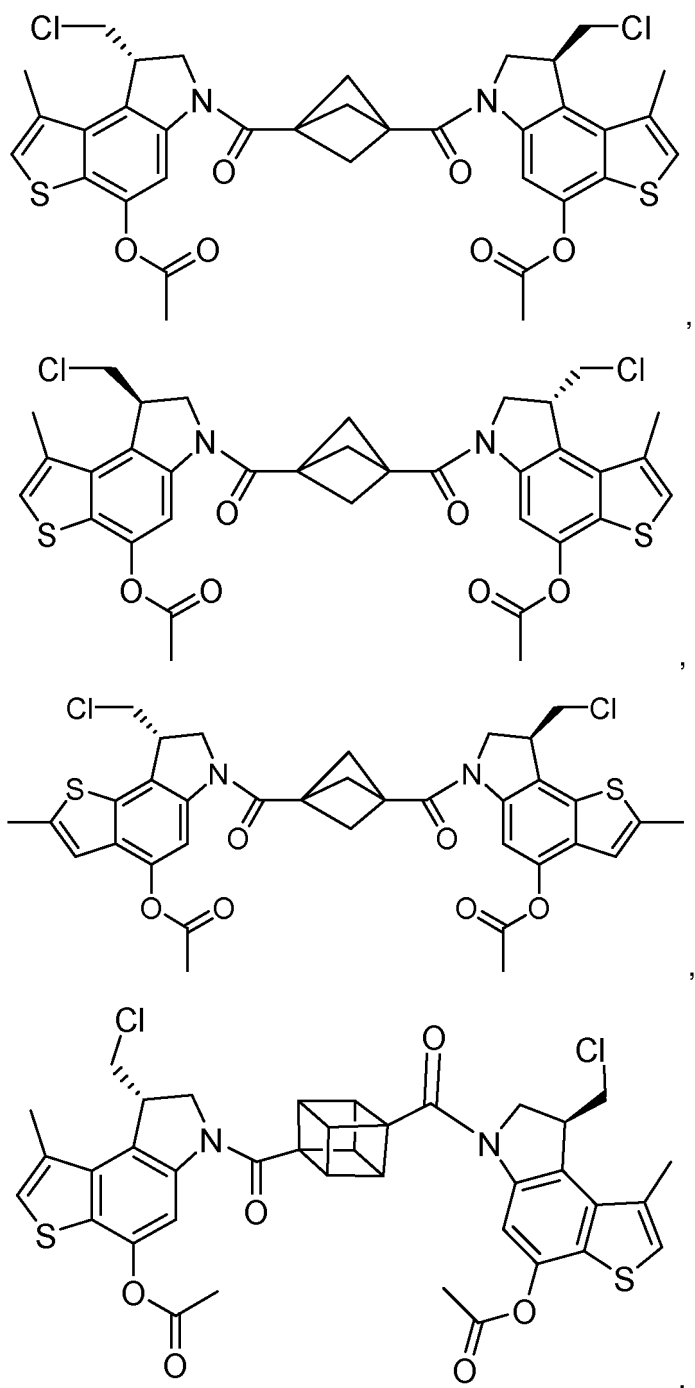


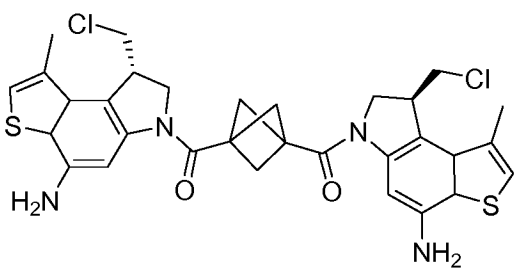
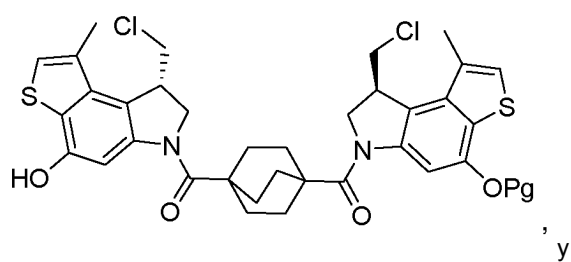
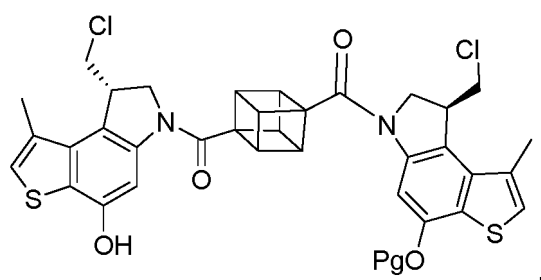
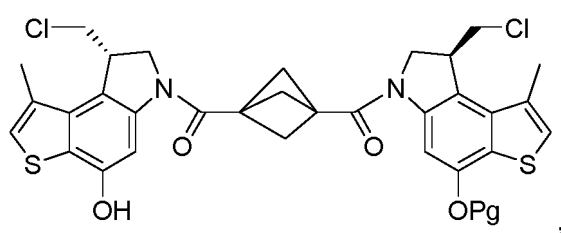
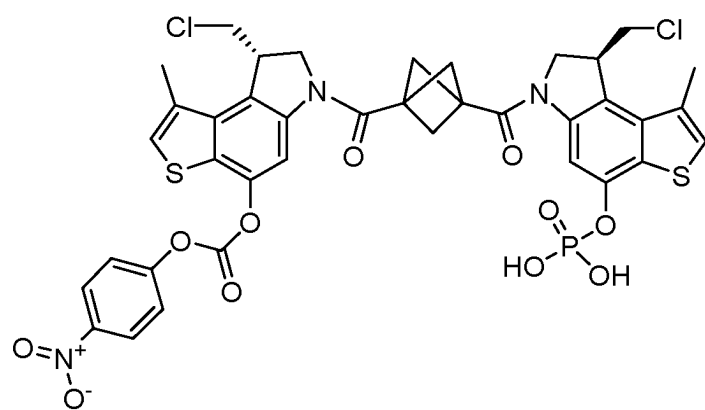
y



REIVINDICACIONES

1. Un compuesto, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, seleccionado entre:

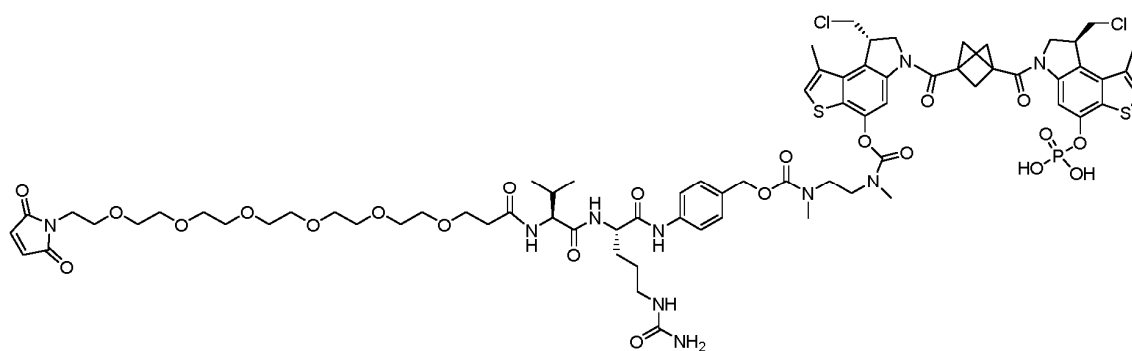




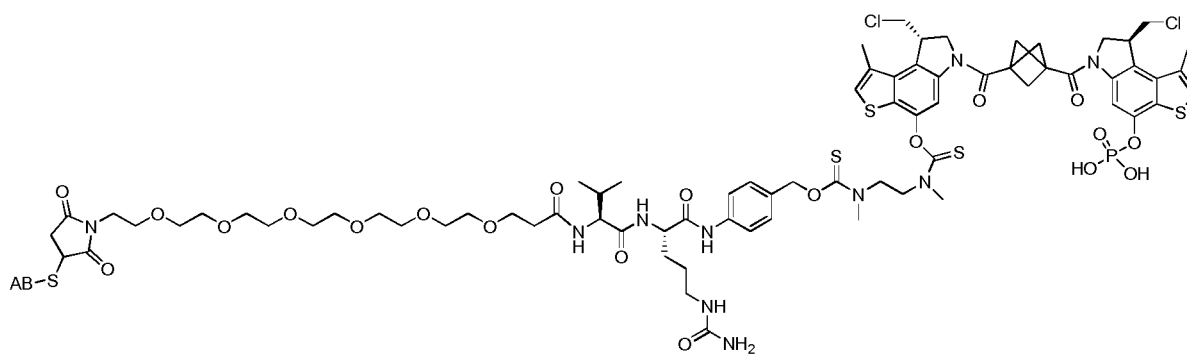
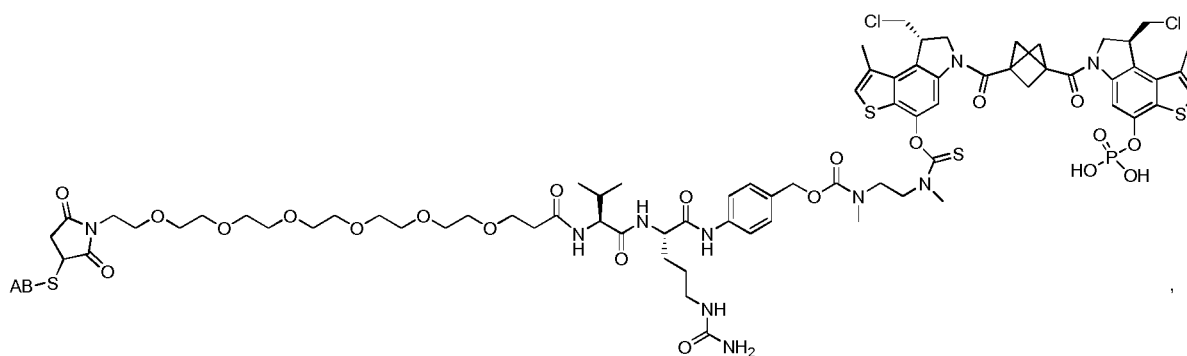
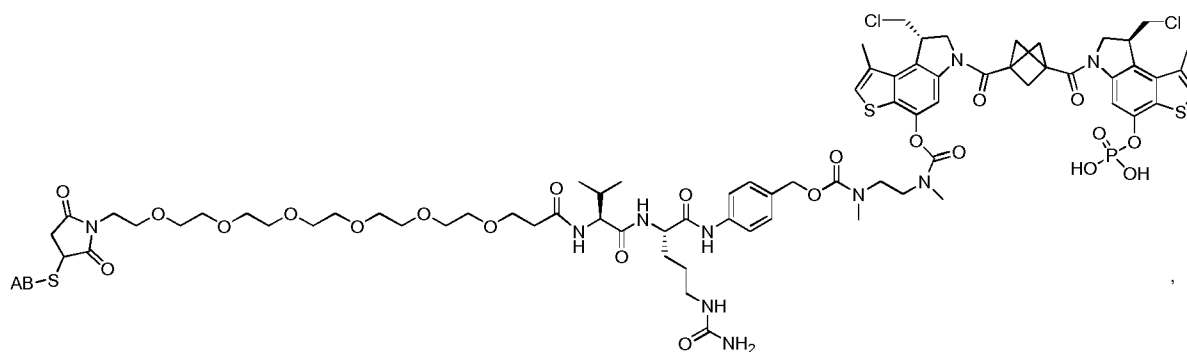
5

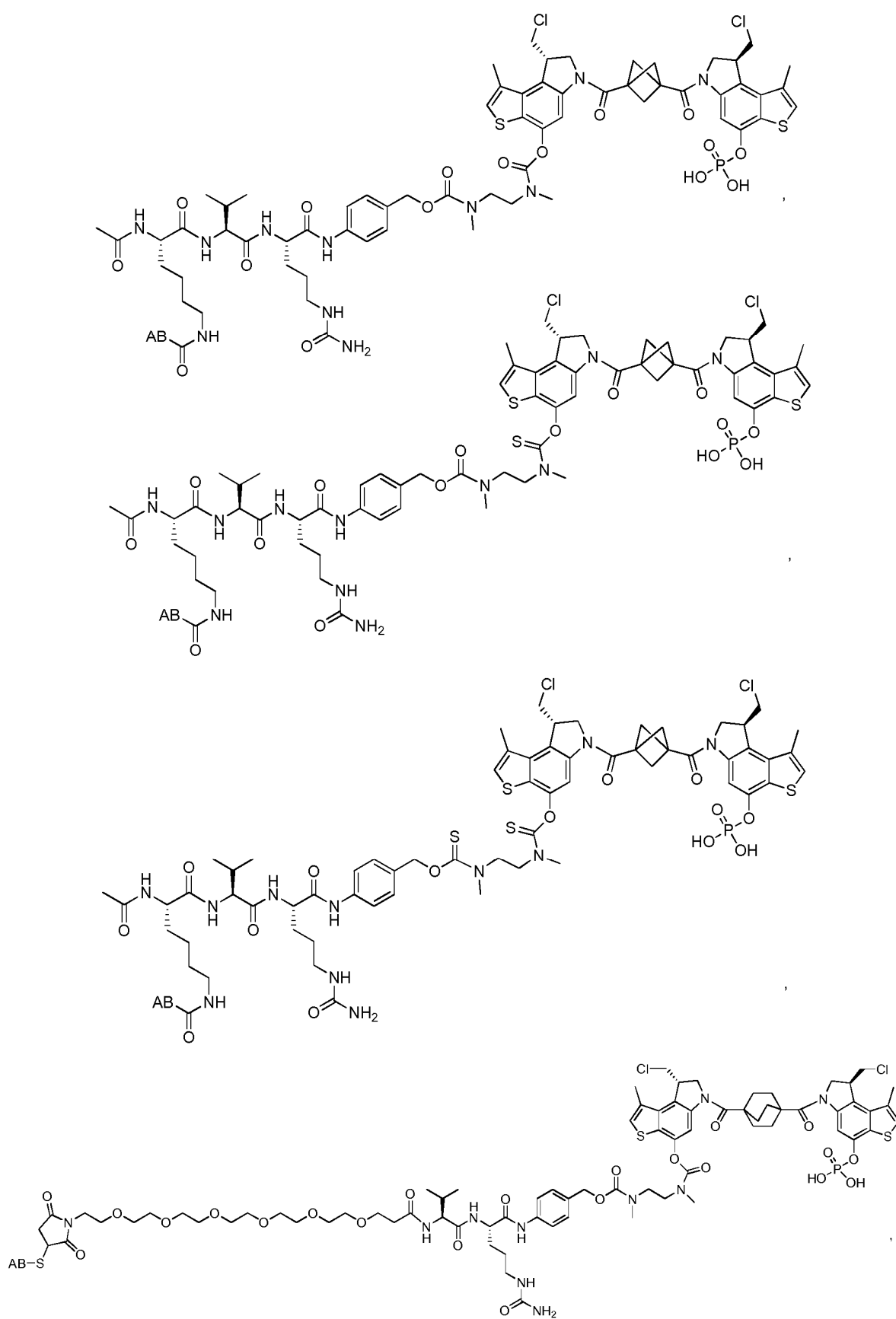
donde Pg es H, acilo, PO_3H_2 o glicosilo.

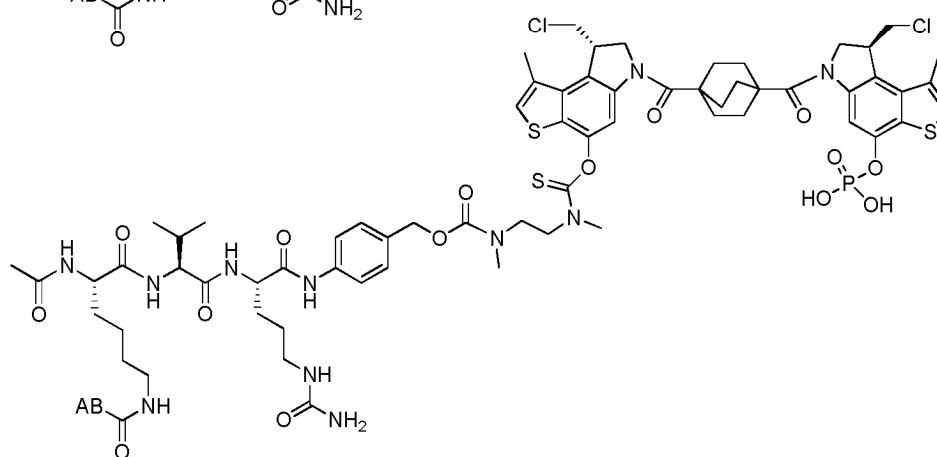
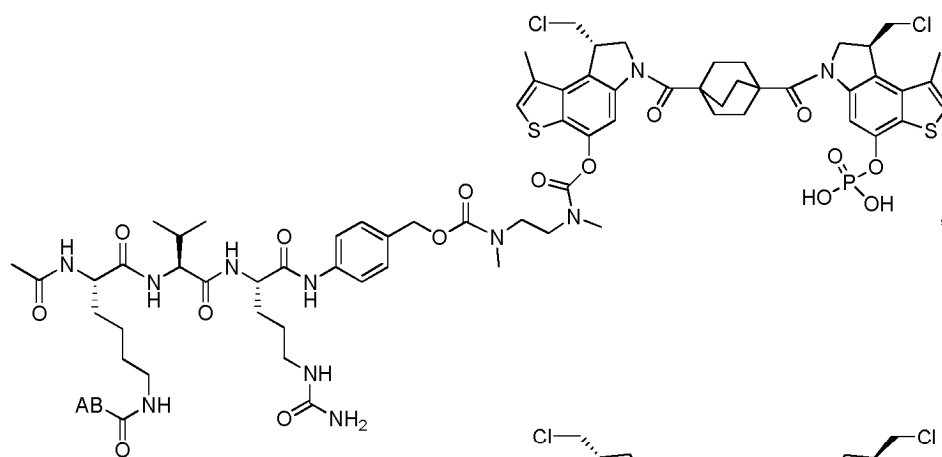
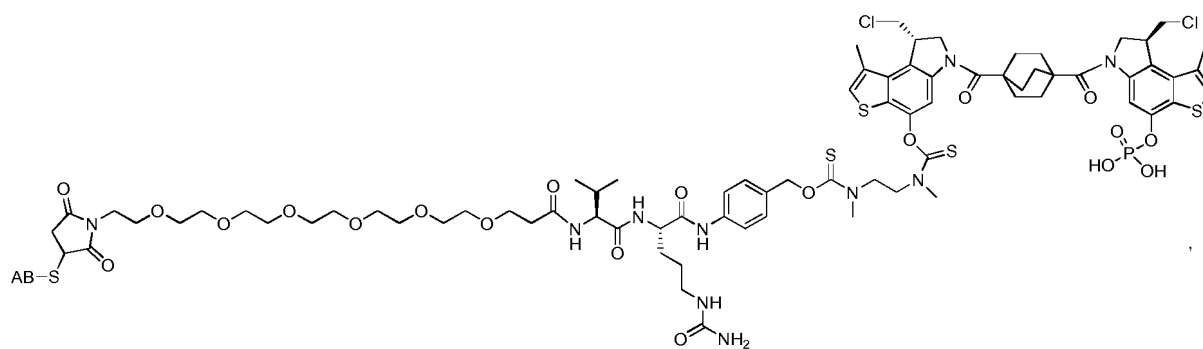
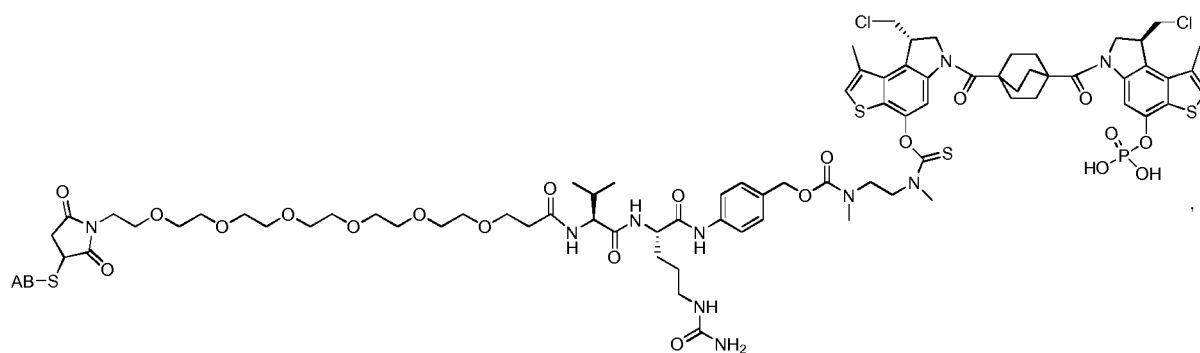
2. Un compuesto, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, seleccionado entre:

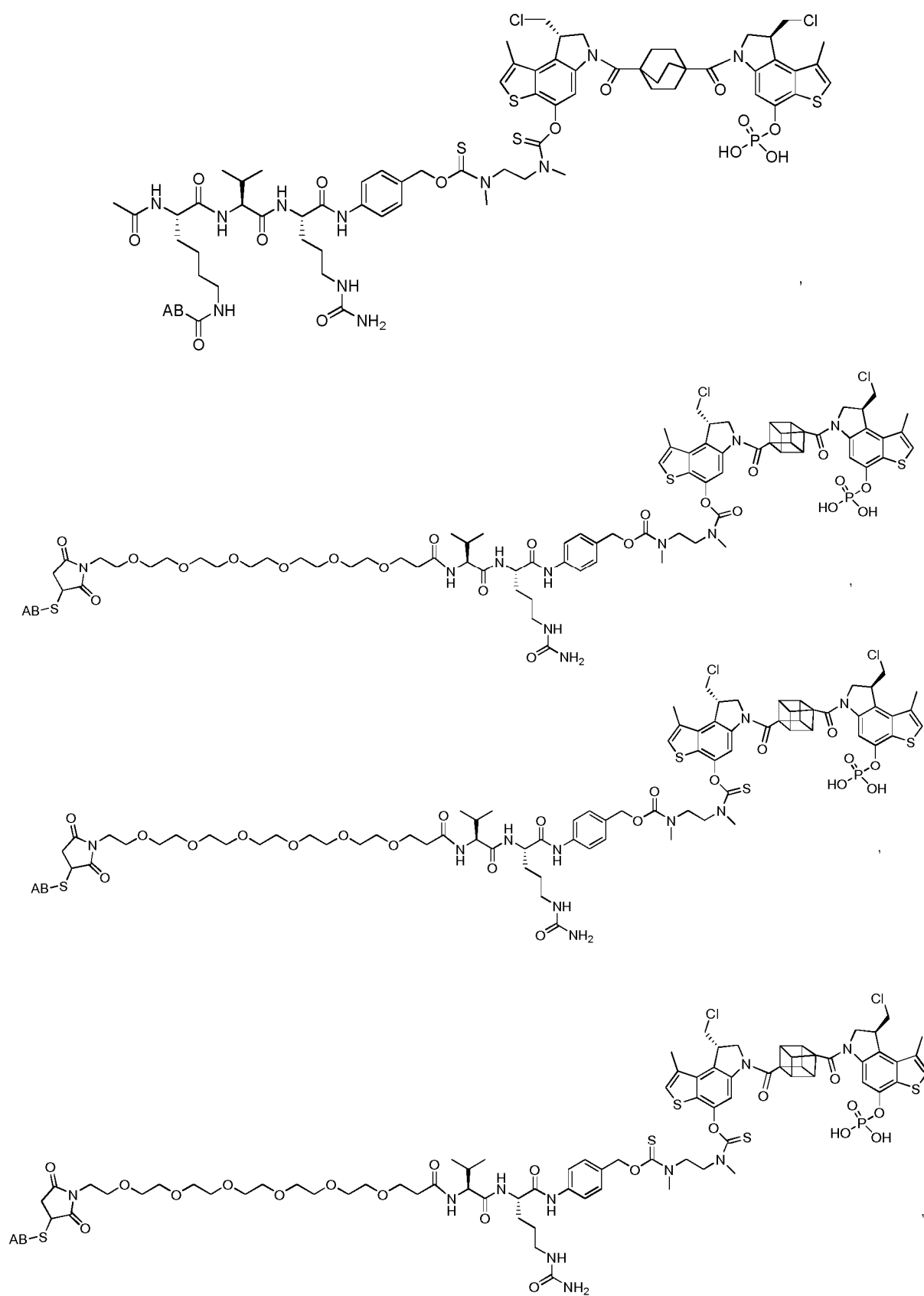


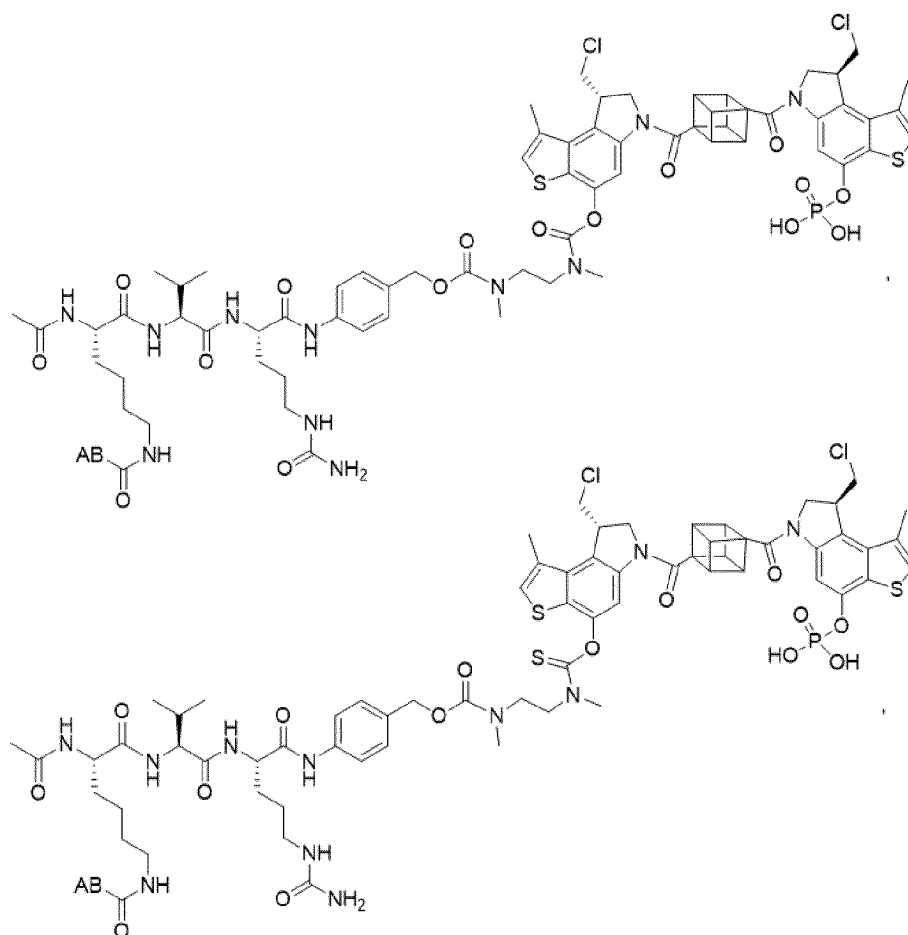
3. Un compuesto, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, seleccionado entre:



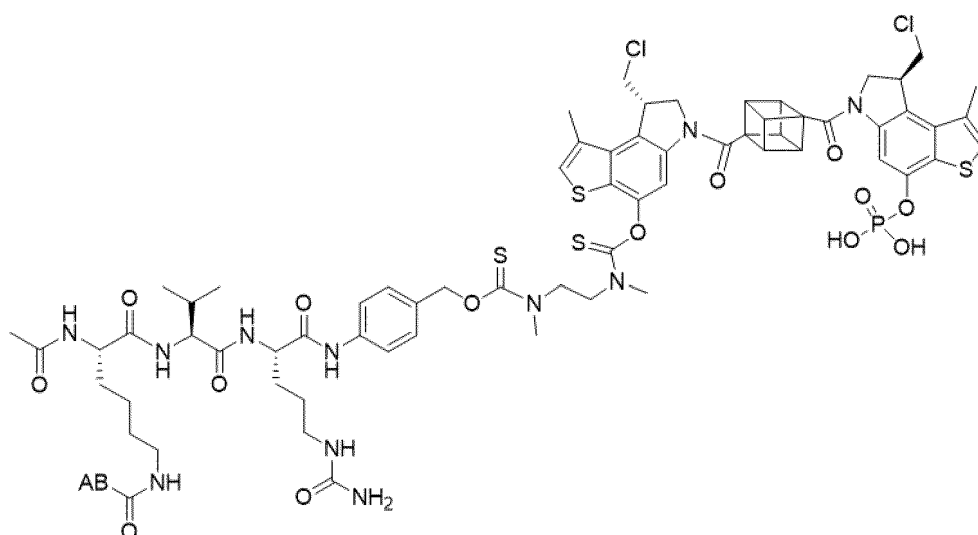








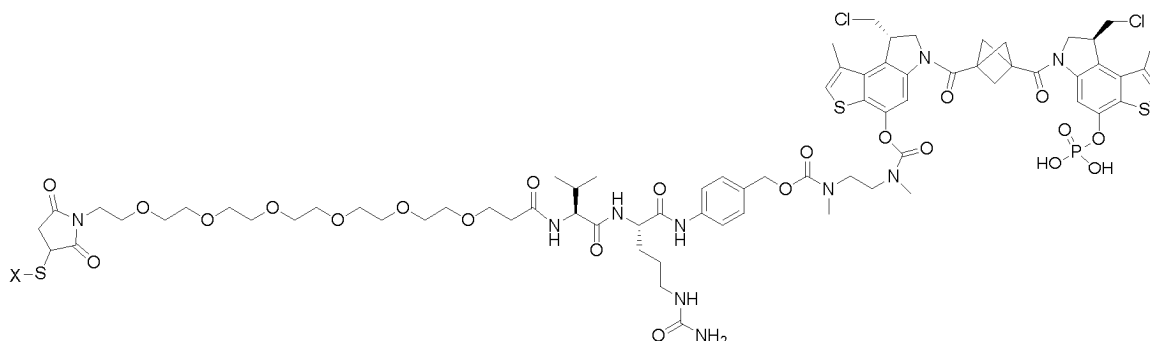
y



donde AB es un anticuerpo.

- 5 4. El compuesto de la reivindicación 3, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que dicho anticuerpo AB se selecciona entre trastuzumab, mutantes de trastuzumab, oregovomab, edrecolomab, cetuximab, un anticuerpo monoclonal humanizado para el receptor de vitronectina ($\alpha v \beta 3$), alemtuzumab, anticuerpos anti-HLA-DR, 1311 Lym-1, anticuerpos anti-HLA-Dr10, anticuerpos anti-cd33, anticuerpos anti-cd22, labeltuzumab, bevacizumab, ibritumomab tiuxetán, ofatumumab, panitumumab, rituximab, tositumomab, ipilimumab y gemtuzumab.

5. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 3, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, seleccionado entre:



5 en la que X es un anticuerpo seleccionado entre el grupo que consiste en IL13R α 2-AB08-v1.0, CD33-11A1-v1417-hG1-(C), CD33-11A1-v1417-K334C-K392C-hG1-(C334+C392), y CD33-11A1-v1417-K334C-hG1-(C334).

6. Una carga útil de enlazador o un conjugado anticuerpo-fármaco, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, que comprende un radical de un compuesto de la reivindicación 1.

7. Un conjugado anticuerpo-fármaco, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, que comprende un radical de un compuesto de la reivindicación 2.

10 8. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

9. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, o una composición farmacéutica de la reivindicación 8, para su uso en el tratamiento de cáncer.

15 10. Un compuesto, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, o una composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que dicho cáncer es cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de cuello de útero, cáncer de colon, cáncer de endometrio, cáncer de riñón, cáncer de pulmón, cáncer de esófago, cáncer de ovarios, cáncer de próstata, cáncer pancreático, cáncer de piel, cáncer de estómago (gástrico), cáncer testicular, leucemias y linfomas.